Universidade da Beira Interior

Derivados de Aminoácidos como Ligandos em Cromatografia de Afinidade para a Purificação de Plasmídeos

Ângela Paula Duarte Baptista

Covilhã 2009

Universidade da Beira Interior

Derivados de Aminoácidos como Ligandos em Cromatografia de Afinidade para a Purificação de Plasmídeos

Este trabalho foi elaborado com vista à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, sob orientação da professora Doutora Fani Sousa e co-orientação do professor Doutor Renato Boto.

Ângela Paula Duarte Baptista

Covilhã 2009

" Não basta ensinar ao homem uma especialidade. Porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que é belo, do que é moralmente correcto".

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, por me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e de me suprir em todas as minhas necessidades.

À Professora Doutora Fani Sousa, orientadora desta dissertação, por todo o empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência e paciência. Gostaria de gratificar a sua competência, participação nas discussões, correcções e sugestões que fez com que concluísse este trabalho.

Ao Professor Doutor Renato Boto, co-orientador desta dissertação, pela partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho. Muito obrigado pelos conselhos e boa vontade em atender as minhas dúvidas.

Ao Senhor Vice-Reitor Professor Doutor Paulo Almeida, expresso o meu imenso e profundo reconhecimento por todo o apoio, rigor e exigência demonstrada, como também, todas as oportunidades e dificuldades proporcionadas em cada momento da presente dissertação. Por todos os encorajamentos, disponibilidade e ensinamentos derivados da sua sólida experiência e formação científica, com que sempre me presenteou, o meu bem-haja!

À Mestre Ângela Sousa pelo acolhimento no laboratório, pela sua simpatia e disponibilidade. Para ela vai a minha amizade e o meu agradecimento pelo prazer que foi conviver e trabalhar com ela no laboratório.

Às minhas colegas de laboratório pela ajuda incondicional que me prestaram, pela partilha dos anseios, dificuldades e oportunidades vivenciadas ao longo deste ano.

À Mariana e Joana pela realização dos suportes de arginina e histidina, e por toda a ajuda que me disponibilizaram.

À minha amiga e patroa, Sandra Almeida, por todo o apoio, pela disponibilidade que demonstrou estando sempre disposta a ajudar no que fosse preciso. Obrigado pelo exemplo profissional e pela amizade incondicional.

Aos meus pais, António Batista e Maria Gabriela, que desde sempre incutiram-me os valores e princípios éticos e morais dos quais jamais me afastarei. A eles agradeço o amor, a educação, o carinho, a paciência, o incentivo e todo o esforço acrescido. Foram eles que me transmitiram a renovação diária da força necessária para chegar ao final de cada dia com esperança. Obrigado por acreditarem sempre em mim, amo-vos muito.

À minha irmã, Andreia e ao meu cunhado Rui, pelo apoio incondicional da minha eterna jornada de estudante, pelo carinho, amor, paciência e pelo consolo em qualquer situação.

Não podia deixar de agradecer do fundo do coração ao meu namorado Zé, que me acompanha em pensamento em todos os meus momentos. Obrigado por me ouvires nos bons e maus momentos, pela paciência que demonstraste ao longo da minha vida académica, pela compreensão e principalmente pelo teu amor.

A todos os meus familiares, pelo constante apoio e confiança dedicados.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

"De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre a começar...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...

Façamos da interrupção um novo caminho;

Da queda um passo de dança;

Do medo uma escada;

Do sonho uma ponte;

E da procura...

Um encontro".

Fernando Sabino

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABELAS

RESUMO

Estudos sobre medicina genética e vacinação estão a utilizar o DNA plasmídico (pDNA) como vector e, devido a este facto, tem havido uma procura crescente de doses de pDNA para ensaios clínicos.

Têm sido propostos vários processos baseados na cromatografia, mas a cromatografia de afinidade é considerada a técnica mais específica para a separação do pDNA, uma vez que permite o isolamento desta biomolécula a partir de uma mistura devido ao reconhecimento bioespecífico pelo ligando imobilizado. Pode-se dizer que o recente sucesso desta técnica para a purificação do pDNA baseia-se na bioespecificidade e, a utilização de aminoácidos como ligandos imobilizados produziu recentemente resultados interessantes. Assim, a cromatografia de afinidade baseada em aminoácidos representa sobretudo uma abordagem promissora para purificar biomoléculas, pois combina a selectividade de uma interacção biológica que ocorre naturalmente com a simplicidade de uma única molécula pequena. A histidina e a arginina já revelaram a sua grande aplicabilidade para isolar a isoforma superenrolada do pDNA e, portanto, indicando a presença de interacções específicas entre o pDNA para ambos os aminoácidos.

Neste trabalho são apresentados os resultados sobre a utilização de uma série de ligandos modificados da histidina e da arginina na purificação de plasmídeos para terapia génica. Referiu-se também a preparação dos derivados da histidina e da arginina onde a natureza hidrofóbica são ampliadas pela sua esterificação com álcoois com as cadeias alquilicas de maior comprimento, ou seja, metil, etil, butil, hexil e octil. As amostras do plasmídeo foram carregadas nas matrizes cromatográficas, a fim de se alcançarem os respectivos padrões de retenção e de se encontrar a dependência da interacção em diferentes forças iónicas.

Os resultados gerais mostraram que a introdução de pequenas cadeias alquilicas na arginina e na histidina, tais como os ésteres metil e etil, induziu um aumento na retenção do plasmídio. No entanto, cadeias alquilicas de maior comprimento não favoreceram a interacção, aquando da utilização de tampões de eluição com baixa força iónica. É suposto que a complexidade do ligando possa comprometer o acesso do plasmídeo aos sítios de ligação. Outros estudos ainda estão em desenvolvimento a fim de caracterizarem as interacções induzidas pelos ligandos modificados da histidina e da arginina.

Palavras-chaves:

Afinidade; cromatografia; arginina; histidina.

ABSTRACT

Current developments in gene medicine and vaccination studies are utilizing plasmid DNA (pDNA) as vectors. For this reason, there has been an increasing trend towards larger and larger doses of pDNA utilized in human trials.

Several chromatography-based processes have been proposed but the affinity chromatography (AC) is considered the most specific technique of separation of pDNA, since it allows the isolation of this biomolecule from a mixture due to the biospecific recognition by the immobilized ligand. It can be said that the recent success of this technique for the purification of pDNA lies on the biospecificity and the use of amino acids as immobilized ligands have recently yielded interesting results. Thus, amino acid-based AC represents a particularly promising approach to purify biomolecules since it combines the selectivity of a naturally occurring biological interaction with the simplicity of a single small molecule. Histidine and arginine have already revealed their high applicability to isolate the supercoiled pDNA and therefore proved the presence of specific interactions between pDNA for both amino acids.

In this communication we present our last results on the use of a serial of arginine-modified ligands in AC for the purification of plasmids for gene therapy. We report the preparation of histidine and arginine derivatives where the hydrophobic nature are enlarged by their esterification with alcohols with increasing lengths of alkyl chain, namely methyl, ethyl, butyl, hexyl and octyl one. Plasmid samples were loaded onto the chromatographic matrices in order to achieve the respective retention patterns and to find the dependence of the interactions at different ionic strengths.

The general results revealed that the influence of the introduction of small alkyl chain, like methyl- and ethyl-esters on the histidine and arginine amino acid, induced an increasing of the plasmid retention. However, higher length alkyl chains did not favoured the interaction, when low ionic strength elution buffers were used. We supposed that the complexity of the ligand may compromise the access of plasmid molecules to the binding sites. Further studies are still ongoing in order to fully characterize the interactions induced by all the novel arginine modified ligands.

Keywords:

Affinity; chromatography; arginine; histidine.

LISTA DE ABREVIATURAS

A, adenina

Abs, absorvência

AC, cromatografia de afinidade

AEX, cromatografia de troca aniónica

ATP, adenosina-trifosfato

C, citocina

DNA, ácido Desoxirribonucleico

E. coli, *Escherichia coli*

EMEA, European Medical Agencies

FDA, Food and Drug Administration

G, guanina

gDNA, DNA genómico

HIC, Cromatografia de interacção hidrofóbica

IDA, ácido iminodiacético

IgG, imunoglobulina G

IMAC, cromatografia de afinidade com metais imobilizados

LB-agar, Luria Bertani

nm, namómetros

oc, circular aberta

pb, pares de bases

pDNA, DNA plasmídico

RNA, ácido ribonucleico

rpm, rotações por minuto

sc, superenrolado

SEC, cromatografia de exclusão molecular

T, timina

TB, Terrific Broth

THAC, cromatografia de afinidade por hélice tripla

UV, ultravioleta

V, volt

CAPÍTULO I

(Introdução)

I.1 Processos Biotecnológicos

Nos últimos anos tem-se assistido a um rápido desenvolvimento na área da Biotecnologia, com o aparecimento de novos processos a aplicar a nível industrial que recorrem a microrganismos [1,2]. Actualmente, os processos biotecnológicos têm uma grande aplicação em sectores tais como o agro-alimentar, a química-fina e farmacêutica, a energia e o ambiente, sendo utilizados para a produção de uma vasta gama de produtos com diferentes valores comerciais. Um processo biotecnológico pode então definir-se como aquele em que há uma utilização de micrOorganismos (fermentos, bactérias, etc.) e/ou enzimas, podendo ter como objectivo a síntese de compostos químicos intracelulares (proteínas) ou extracelulares (antibióticos, álcool), a produção de biomassa (caso da produção de fermento de padeiro), de alimentos (bebidas), de energia (biogás, etanol) ou ainda a despoluição biológica de efluentes (degradação da matéria poluente pelos microorganismos). Grande parte das técnicas usadas em biotecnologia é económica, segura, pouco consumidora de energia, e, para muitos processos, os resíduos são biodegradáveis e não tóxicos.

A biotecnologia não é uma prática recente, uma vez que tem vindo a ser correntemente praticada nos últimos anos, mas, o seu grande impulso surgiu nas duas últimas décadas, com o acentuado desenvolvimento na biologia molecular [3] e no controlo dos processos fermentativos [4]. Assim, não só se criaram novas aplicações para a biotecnologia como se melhorou a eficiência e a economia das já estabelecidas indústrias biotecnológicas. A produção num processo biotecnológico pode dividir-se em duas categorias: reacções de crescimento microbiano (reacções microbiológicas), e reacções catalisadas por enzimas (reacções bioquímicas ou bio-transformações). O crescimento dos organismos num reactor decorre através do fornecimento ao meio líquido de certos nutrientes ou substratos (fontes de carbono, azoto, oxigénio, vitaminas, micronutrientes) na presença de condições ambientais favoráveis (temperatura, pH, arejamento, agitação). Um reactor é, portanto, um tanque onde ocorre uma ou várias reacções biológicas geralmente em meio líquido.

A figura 1 representa a variação do número de células vivas ao longo do tempo para o crescimento de um dado microorganismo em cultura descontínua. São evidenciadas as várias fases do crescimento: uma primeira fase, após inoculação, em que não se verifica crescimento - fase de latência (1), uma fase de aceleração (2), uma fase de crescimento

exponencial (3) seguida de desaceleração (4), para se atingir uma fase estacionária (5) em que se alcança o máximo crescimento celular. Eventualmente, poderá ocorrer de seguida um declínio no número de células - fase de decaimento ou morte celular (6).

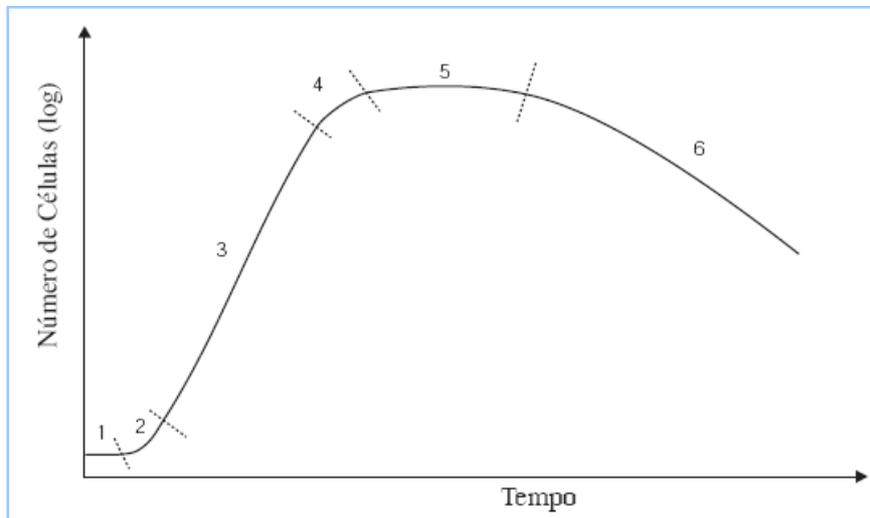



Figura 1 Fases do crescimento de um microorganismo em cultura descontínua. Adaptado de Ferreira E.C (1995)

O objectivo geral de um processo biotecnológico com crescimento microbiano, muitas vezes designado de fermentação, é minimizar a duração da fase de latência e maximizar a taxa de crescimento e a duração da fase exponencial. É comum perspectivar a obtenção da dimensão para uma dada população no final do crescimento. A dinâmica dos processos de fermentação é consequência da cinética de crescimento dos microorganismos, da hidrodinâmica e tipo de reactor, do modo de alimentação de substratos e nutrientes [4].

Um processo biotecnológico pode ser dividido em três fases: preparação do extracto que inclui a redução de tamanho e fraccionamento, esterilização das matérias-primas e do equipamento para crescimento do microrganismo; produção do microorganismo e a formação do bioproduto desejado; recuperação e purificação do produto, que consiste no seu isolamento e purificação a partir do meio de fermentação [5].

Os microorganismos são fontes muito importantes de produtos biotecnológicos e têm sido desenvolvidas novas tecnologias de modo a:

1) Aumentar a produção desses produtos através da tecnologia do ácido desoxirribonucleico (DNA) recombinantes (hiperprodução por manipulação genética);

2) Aumentar o grau de extracção do produto do meio de fermentação;

3) Integrar a fermentação com a recuperação e purificação de modo a obter um produto puro e económico.

A aplicação da tecnologia de DNA recombinante permitiu a obtenção de produtos heterólogos, nomeadamente vacinas, proteínas terapêuticas, enzimas. Apesar da disponibilidade das técnicas de clonagem, existe uma série de passos desde a introdução da informação genética num vector e num organismo hospedeiro até à obtenção do produto. Consequentemente, todos os passos do processo, a montante e a jusante, têm de ser optimizados, de modo a obter o bioproduto com as características desejadas e economicamente rentável [6,7].

I.2 O interesse do DNA como agente terapêutico

Desenvolvimentos recentes na biologia molecular permitiram a evolução de novas tecnologias para a produção de biomoléculas complexas. Um dos passos mais importante e economicamente dispendioso é o isolamento e purificação de moléculas alvo. Ao longo dos últimos anos tem-se testemunhado um esforço acrescido no desenvolvimento de novos métodos para a purificação de plasmídeos [8-10]. Este esforço tem sido motivado principalmente pela introdução de terapias moleculares, tais como a terapia génica e as vacinas de DNA. Apesar destas metodologias ainda enfrentarem alguns problemas, têm o potencial para revolucionar a indústria da saúde nos próximos anos. Ambas se baseiam no mesmo princípio de introdução de ácidos nucleicos em células humanas para restaurar, cancelar, reforçar ou introduzir uma função bioquímica. No entanto, não existem ainda métodos eficientes para o tratamento de uma série de doenças devido à ineficácia de alguns métodos terapêuticos convencionais [11]. Deste modo, surgem estes tratamentos inovadores com o intuito de tentar solucionar esses problemas. A aplicação do DNA plasmídico (pDNA) para a vacinação usando DNA e terapia génica [12,13] representa a próxima geração de biofármacos. Devido ao progresso de ensaios clínicos, tem sido observada uma crescente procura do pDNA com uma boa qualidade para o tratamento destas desordens humanas [14-19].

I.2.1 Terapia génica

A tecnologia do DNA recombinante e a sequenciação do genoma humano levaram a descobertas revolucionárias especialmente nestas áreas da terapia génica e nas vacinas de DNA [20,21]. A terapia génica consiste numa estratégia terapêutica na qual os ácidos nucleícos são introduzidos em células humanas a fim de corrigirem a sua informação genética para fins terapêuticos [20] como forma de prevenir, tratar e curar doenças genéticas ou doenças adquiridas, tais como o cancro e SIDA [21]. A terapia génica tem inúmeras vantagens para o tratamento deste tipo de desordens, mas a sua realização exige uma melhoria nos mecanismos de introdução de DNA exógeno em células somáticas. Especificamente, os vectores são necessários uma vez que permitem uma transfecção eficiente, controlam o tempo de expressão e especificidade das células, bem como minimizam preocupações relativamente à segurança [22-26]. Para além disso, os vectores devem ter uma produção mássica economicamente rentável, de modo a obterem um impacto clínico [27,28]. Assim, para a entrega efectiva dos ácidos nucleicos às células alvo e, quer os vectores virais (retrovírus, vírus adeno-associados) como os não virais (DNA complexado com polímeros catiónicos e lípidos), têm sido desenvolvidos para fornecer essa eficiência [29,30].

Durante muitos anos pensava-se que os vírus inactivos seriam o veículo ideal para transportar o material genético para o interior das células, no entanto, estudos sobre a possível utilização de retrovírus [31] e vírus adeno-associados [32] para o transporte de DNA mostram desvantagens como a integração do vector em regiões codificantes do genoma do hospedeiro. Deste modo, a utilização de vectores virais na entrega de genes levantou questões de segurança e de regulação devido à sua toxicidade e imunogenicidade, bem como a possibilidade de activação e desactivação de genes supressores de tumores [29,30]. Devido a estas razões, vectores não-virais tais como polímeros catiónicos e lípidos, surgiram como uma segunda alternativa originando um aumento na utilização destes sistemas para entrega dos ácidos nucleicos às células alvo, apresentando-se deste modo como o sistema de transferência génica mais atractivo para fins comerciais [33].

Embora os genes terapêuticos possam ser transportados por vários tipos de vectores [33], os vectores de pDNA são considerados mais seguros, mais simples de usar e mais fáceis de produzir em grande escala [34]. Estudos realizados por Chattergoon e seus

colaboradores verificaram que a transfecção afecta a fisiologia da célula [35]. Neste caso particular foi estudada a captação e expressão *in vivo* de transgenes inseridos num plasmídeo injectado no músculo da perna de camundongos [36]. A expressão de proteínas heterólogas foi detectada 60 dias após a injecção, indicando que os genes eram expressos *in vivo* durante um período alargado de tempo, sugerindo potenciais aplicações terapêuticas [36,37]. Desde então, a injecção intramuscular de pDNA tem sido amplamente utilizada na terapia génica e em vacinas de DNA. Deste modo, o número de protocolos aprovados utilizando métodos de entrega de genes com base em vectores de pDNA aumentou cerca de 25 % desde 1995 ao passo que o número de protocolos aprovados usando vectores virais decresceu [38,39]. Em particular, o pDNA está a ganhar um grande interesse (figura 2) uma vez que apresenta um perfil de segurança adequado, não induz toxicidade e é mais simples de desenvolver que os sistemas virais actuais [40].

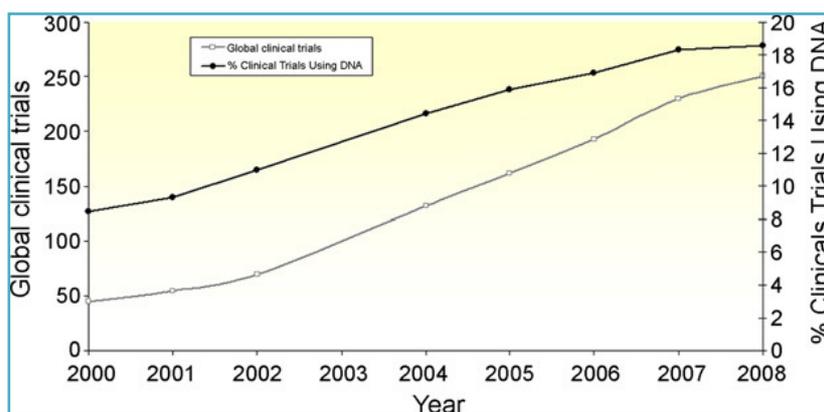



Figura 2 O interesse crescente do pDNA como vector de escolha para ensaios de terapia génica. Adaptado de Ulmer *et al.,* (1996)

A acentuação da aplicação de pDNA em ensaios pré-clínicos e clínicos de terapia génica e vacinas de DNA está na base do aumento da necessidade de obter grandes quantidades de pDNA com elevado grau de pureza [41,42] de acordo com as exigências das agências reguladoras como o Food and Drug Administration (FDA) e European Medical Agencies (EMEA) [41,43]. O pDNA destinado à aplicação terapêutica deve ser essencialmente puro, sem vestígios de DNA genómico (gDNA), ácido ribonucleico (RNA), endotoxinas, e proteínas do hospedeiro [21]. Além disso, o plasmídeo deve estar preferencialmente na forma topoisomérica superenrolada (sc), que é um produto mais eficaz para a transfecção de células alvo e na expressão genética do que as

isoformas circular aberta (oc), linear, multiméricas ou parcialmente desnaturadas [21,44,45]. Esta conformação influencia processos fundamentais que ocorrem nas células como a replicação do DNA, recombinação e transcrição [46-49], uma vez que possui elevadas quantidades de energia livre de Gibbs (G) que é usada nas reacções biológicas.

Esta conformação plasmídica apresenta um comportamento dinâmico em que as dimensões e forma desta podem variar e apresentam ramificações que se formam e retraem rapidamente [46,49]. As moléculas de plasmídeo podem-se deformar ou expandir através do aumento ou diminuição da força iónica do solvente, respectivamente [49] ou pela modificação do tipo de contra-iões (catiões) [50].

I.2.2 Vacinas de DNA

A imunização por DNA foi introduzida como um novo método no início da década de noventa. Vários investigadores demonstraram que as vacinas de DNA contêm genes específicos que codificam proteínas alvo e podem activar quer a imunidade mediada por células quer as respostas humorais [8], obtendo deste modo uma elevada protecção contra as doenças [51-53] e conferindo um maior controlo sobre o processo de imunização [8] (figura 3). Ao contrário das vacinas vivas atenuadas, nestas vacinas não há indícios de risco de inversão causando doença [54].

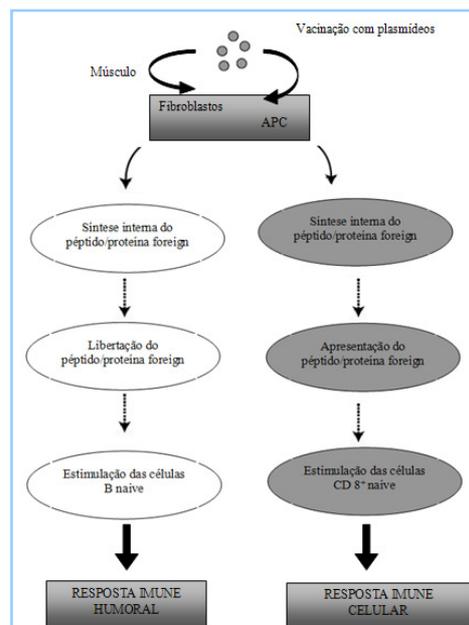



Figura 3 Resposta imune à vacinação pelo pDNA.

Adaptado de Chartrain *et al.*, (2003)

Recentemente, a utilização de várias vacinas de DNA para o tratamento de certas doenças tais como a hepatite, tuberculose, SIDA, influenza e malária têm progredido para uma avaliação clínica. Se este tipo de vacinas revelarem ser eficazes, a escala de produção aumentará e a prevenção de epidemias irá exigir uma taxa de vacinação superior a 60 % [55].

I.3 Características do DNA plasmídico

Os plasmídeos são moléculas de DNA extra-cromossómicas de cadeia dupla, covalentemente fechadas, codificando uma variedade de funções que não são essenciais para a sobrevivência do hospedeiro, mas incrementam a habilidade deste para a sobrevivência em condições atípicas [56]. Os plasmídeos são incorporados e produzidos em bactérias, como a *Escherichia coli* (E. *coli*), que crescem por fermentação e quando recuperados encontram-se naturalmente na forma sc mas existe também uma fracção na forma oc [42]. O baixo conteúdo de pDNA (< 3%) nas células de *E. coli* e a sua similaridade relativamente às propriedades de carga e tamanho com os principais contaminantes (RNA e gDNA) tornam o processo de purificação um desafio [57-59]. Os plasmídeos são moléculas muito grandes (Mr > 10^6, tamanho na ordem dos μm) quando comparados com as proteínas [42] e a replicação não está sincronizada com a replicação do cromossoma do hospedeiro bacteriano. Os plasmídeos variam muito no número de cópias (1-1000 cópias por célula), dependendo da origem de replicação e do tamanho [60]. Cada cadeia desta molécula é um polímero linear desoxirribonucleico ligado por ligações fosfodiéster. Estes grupos fosfato apresentam carga negativa para pH>4. A junção de duas cadeias de DNA anti-paralelas, resulta numa estrutura em dupla hélice, que é estabilizada por ligações por pontes de hidrogénio entre nucleótidos complementares de cadeias opostas. As bases aromáticas dos nucleótidos estão inseridas umas sobre as outras e orientadas para o interior da molécula, perpendicularmente à estrutura açúcar-fosfato. O interior da hélice dupla é, portanto, altamente hidrofóbico devido à presença das bases aromáticas [47]. Os plasmídeos podem existir sob diferentes conformações topológicas (figura 4), nomeadamente na conformação sc, a conformação oc, linear, e multimeros. A isoforma sc surge quando o eixo da hélice do pDNA está enrolado tridimensionalmente sobre si próprio, formando esta molécula de ordem superior [10], caso o plasmídeo sofra um corte numa das cadeias a estrutura sc

perde-se, originando uma estrutura oc e, se o corte for em ambas as cadeias a estrutura passa a ser linear [47].

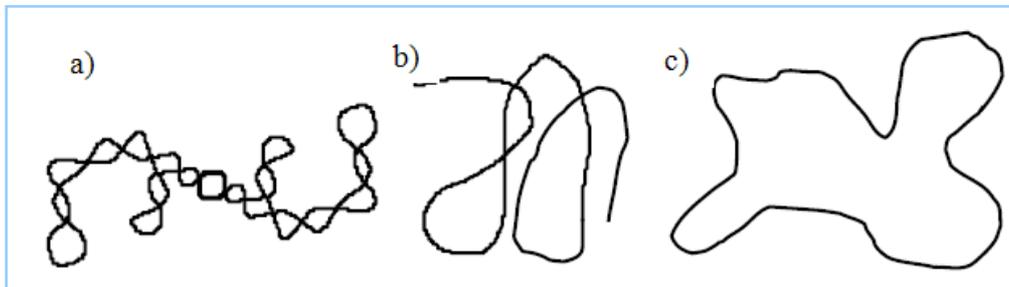



Figura 4 Representação das diferentes isoformas do pDNA : a) superenrolada, b) linear e c) circular aberta. Adaptado de Schleef *et al.,* (2004)

I.4 Produção de DNA plasmidíco

O processo de desenvolvimento para a produção do pDNA geralmente começa numa pequena escala, com a construção e selecção de vectores de expressão apropriados, produção de microrganismos seguido pela selecção e optimização das condições de fermentação ("processos upstream"), crescimento celular e finalmente o isolamento e purificação ("processos downstream") (figura 5).

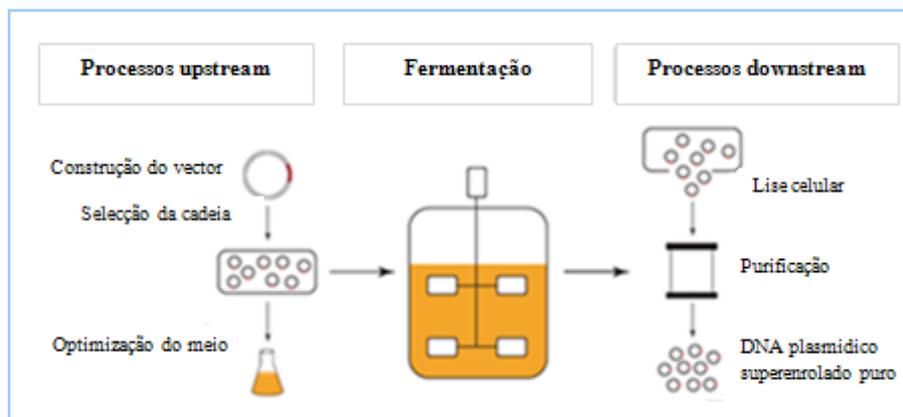



Figura 5 As duas fases do processo de desenvolvimento do pDNA.
Adaptado de Prazeres *et al.,* (2000)

Estas 2 etapas do processo ("upstream" e "downstream") são integradas, não devendo ser abordadas individualmente [61]. No entanto, a optimização de cada passo pode ser realizada com vista ao melhoramento do processo global.

Um processo fermentativo típico conduz geralmente a uma solução aquosa diluída contendo água como componente principal (80-100%), produto(s) (0-20%), subprodutos (0-10%), nutrientes residuais (0-5%) e biomassa (0-5%). O produto de interesse pode encontrar-se na solução aquosa (produtos extracelulares) ou no interior da célula (produtos intracelulares). A localização do produto influencia a selecção do processo de isolamento e purificação. Por outro lado, consoante a aplicação a que se destinam os bioprodutos e o grau de pureza pretendido, as fases de fermentação e de purificação têm pesos significativamente diferentes no custo global do processo. Apesar da grande variedade de produtos que se podem obter por fermentação, a recuperação e purificação do bioproduto segue um esquema genérico, formado por uma série de passos para a obtenção desses bioprodutos com as características desejadas. Assim, o processo de recuperação e purificação de um bioproduto obtido por fermentação consiste em três etapas principais: separação, concentração e purificação [62,63].

Têm sido extensamente estudados métodos de fermentação para a produção de plasmídeos usando *E. coli* [64,65] em que a produção do pDNA é maioritariamente realizada em erlenmyers ou em fermentadores usando estratégias de "batch" ou "fedbatch" [66-69]. Os processos de produção de pDNA que apliquem uma metodologia de fermentação "batch" resultam normalmente em baixos rendimentos e baixo conteúdo de plasmídeos. Quando uma cultura média é colocada neste tipo de fermentador, normalmente a capacidade de transferência de oxigénio deste é excedida, resultando num ambiente limitado de oxigénio. Esta falta de oxigénio desencadeia o metabolismo da *E. coli* levando à produção de subprodutos tóxicos que limitam o crescimento, induzindo a morte celular [70-72]. A fermentação por "fedbatch" fornece nutrientes ao longo de um período de tempo mais alargado, de modo a alcançar o controlo da disponibilidade de nutrientes para um nível compatível com as capacidades de transferência de oxigénio do fermentador. Isto resulta numa maior densidade celular, num maior rendimento de produção de plasmídeo e de melhor qualidade.

A estratégia de fermentação deve ser estabelecida de forma a obter elevadas densidades celulares em condições que permitam a replicação e estabilidade plasmídica, aumentando-se deste modo o número de cópias durante o crescimento celular [73]. Ao optimizar o rendimento do pDNA para uso terapêutico, há que ter em conta três factores: cultura mássica, número elevado de cópias de plasmídeos e qualidade do plasmídeo. Relativamente ao primeiro factor, obviamente uma maior densidade celular

rende mais plasmídeo por unidade de volume de cultura. A massa de cultura pode ser melhorada através da optimização de vários parâmetros como o pH, percentagem de oxigénio dissolvido, temperatura, concentração e tipo de nutrientes presentes no crescimento. A expressão de um gene de interesse inserido num plasmídeo é indesejável durante o processo de fermentação e, em alguns casos a expressão de derivados de plasmídeo pode dificultar o crescimento e, consequentemente, afecta a produção do pDNA [52,67].

A produção económica de plasmídeos em larga escala a partir da *E .coli* exige também a optimização do número de cópias do plasmídeo (rendimento específico). É muito importante conseguir rendimentos específicos elevados e impacto positivo nos processos de purificação [64,65,73]. Alguns factores devem ser também controlados de forma a induzir o mínimo stress possível durante o crescimento, de forma a garantir a manutenção do plasmídeo na sua conformação activa, a conformação sc.

I.5 Desintegração celular

Embora alguns produtos biológicos sejam secretados pela célula ou libertados durante a sua autólise, muitos outros, entre eles vacinas, proteínas terapêuticas e enzimas, requerem a ruptura da célula hospedeira para libertar o produto desejado. Deste modo, a ruptura celular assume grande importância por ser um dos primeiros passos do isolamento e purificação de bioprodutos intracelulares, sendo crucial a forma como se obtém o produto. Este, pode ser obtido por tratamento mecânico, químico, físico-químico ou enzimático da parede e da membrana celular. Os métodos de ruptura mecânicos relacionam-se com a aplicação de tensões de corte entre a célula e o meio líquido ou entre a célula e um corpo sólido. No primeiro caso a ruptura é obtida por colisão, cavitação ou impacto a alta velocidade. No segundo caso por agitação intensa com pequenos corpos sólidos, ex: moinho de bolas [74]. O tratamento químico visa a dissolução ou fragilização da parede celular. Apresenta como inconvenientes o custo dos reagentes usados, a toxicidade dos mesmos e a dificuldade na sua recuperação (reciclagem). O tratamento com hidróxido de sódio constitui uma alternativa económica de lise, é facilmente aplicável em grande escala mas como desvantagem apresenta o problema da toxicidade. Algumas enzimas podem ser usadas para a digestão da parede celular, expondo a membrana à ruptura por processos físicos. A sua utilização é

comprometida pelo seu elevado custo, pela impossibilidade de reciclagem num processo de separação industrial e pela possibilidade de contaminação do produto final com actividade enzimática residual.

A selecção do método mais adequado para romper a parede celular de uma dada célula depende de vários factores [75]:

1) Tipo de célula (bactérias, leveduras, fungos, células animais e vegetais);

2) Localização do produto intracelular;

3) Aplicação pretendida para o produto;

4) Sensibilidade do produto à temperatura e às forças de tensão de corte;

5) Facilidade de recuperação do produto dos segmentos celulares;

6) Simplicidade do método e custos de operação;

7) Quantidade de células a processar.

A escolha do método de desintegração mais adequado tem um efeito marcante, não só no rendimento como também nos passos posteriores. Assim, neste passo é desejável uma desintegração completa da célula e simultaneamente a obtenção de rendimentos e integridade do produto elevadas [62,63,76,77]. Neste passo de desintegração, todos os componentes intracelulares são libertados, incluindo pDNA, RNA, gDNA, endotoxinas e proteínas. Esta libertação e recuperação de grandes quantidades da isoforma sc do pDNA são cruciais a fim de se obterem elevados rendimentos. No entanto, a sensibilidade do plasmídeo, a presença de moléculas de gDNA [78] bem como a elevada viscosidade do lisado [79], são as maiores preocupações durante a libertação do plasmídeo [42].

Embora muitas técnicas sejam usadas laboratorialmente, poucas são as susceptíveis de aplicação em processos de grande escala. Deste modo, a quantidade de células é um factor importante à escala industrial e, para que um método de desintegração celular possa ser usado nesta escala deve obedecer aos seguintes requisitos: velocidade de desintegração elevada, pois o tempo de operação é um factor essencial para a economia do processo, custos de operação e manutenção baixos e manutenção da integridade dos produtos intracelulares.

I.6 Purificação do DNA plasmídico por cromatografia

Foi em meados do século passado que, pela primeira vez se efectuaram trabalhos científicos em que a cromatografia era a base para a separação de compostos. Com origem no grego "chroma + graphein", a cromatografia ou escrita da cor, é um método contemporâneo que ganhou relevo por volta de 1903, com o botânico Mikhail Semenovich Tswett.

Tswett foi considerado o pai da cromatografia moderna, através dos vários trabalhos experimentais que efectuou, particularmente na separação de extractos de plantas por adsorção diferencial em colunas, tendo verificado a nítida separação de diversos pigmentos corados. Desde então, enormes avanços têm sido concretizados no desenvolvimento e aperfeiçoamento desta importante técnica de separação [80].

A descoberta da cromatografia por M. Tswett foi um passo decisivo na evolução do uso da adsorção como técnica de separação, tendo possibilitado importantes aplicações analíticas e preparativas em várias áreas científicas.

Apesar da disponibilidade de diferentes métodos de purificação de biomoléculas, actualmente a técnica de cromatografia tem sido utilizada com frequência devido ao seu elevado poder de resolução. Estima-se, actualmente, que mais de 50% das análises efectuadas em todo o mundo envolvam técnicas cromatográficas cujo princípio básico envolve uma separação de misturas por interacção diferencial dos seus componentes entre uma fase estacionária (líquido ou sólido) e uma fase móvel (líquido ou gás). Em todos os sistemas cromatográficos existem três elementos fundamentais, nomeadamente a fase estacionária, a fase móvel e a amostra a separar. A separação dos componentes da amostra é geralmente conseguida por eluição, em que as forças de ligação à matriz são perturbadas através da alteração da composição da fase móvel de um modo contínuo (gradiente linear) ou de um modo descontínuo (gradiente por passos) [81].

A cromatografia é uma das técnicas mais poderosas e versáteis [82] uma vez que permite a separação tanto de moléculas pequenas como de macromoléculas (proteínas ou ácidos nucleícos), bem como de misturas muito complexas. Os processos cromatográficos normalmente conduzem a selectividades elevadas e além disso as condições de operação são suaves, ocorrem à temperatura ambiente, os eluentes usados são soluções aquosas e não se observam tensões de corte que danifiquem os bioprodutos. Apresentam também a vantagem de se poderem usar pequenas quantidades

de amostra sem haver, no geral, perigo de decomposição dos diferentes componentes, dando uma precisão qualitativa e quantitativa elevada. Os factores que influenciam a eficiência de um processo cromatográfico são a qualidade do suporte cromatográfico, a dispersão axial e a dificuldade de estabelecimento de equilíbrio entre as fases móvel e estacionária.

Os suportes mais utilizados em cromatografia são polissacáridos (dextrano, agarose e celulose), polímeros sintéticos (como poliacrilamida, poliestireno), materiais inorgânicos (sílica porosa, hidroxiapatite e vidro poroso) e materiais compósitos (poliacrilamida-agarose, dextrano-bisacrilamida, sílica porosa-dextrano). Podem distinguir-se vários tipos de processos cromatográficos tendo em conta a natureza das interacções envolvidas e que são descritos em seguida [5]. A escolha do tipo de cromatografia depende das características biológicas e físico-químicas das biomoléculas, como hidrofobicidade (cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de fase reversa), tamanho (cromatografia de filtração em gel), carga eléctrica (cromatografia de troca iónica) e características de bioespecificidade (cromatografia de afinidade).

I.6.1 Cromatografia de interacção hidrofóbica

A cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC) é uma técnica de biosseparação baseada essencialmente na interacção entre uma região hidrofóbica imóvel do ligando e as regiões apolares da superfície das biomoléculas, especialmente em proteínas e péptidos. As áreas hidrofóbicas das moléculas ligam-se aos ligandos hidrofóbicos da coluna e, quanto mais hidrofóbico for o constituinte, mais forte será a ligação à coluna [83]. Como mostra na figura 6, as moléculas mais hidrofóbicas ligam-se ao ligando ficando retidas na coluna, ao passo que as hidrofílicas (moléculas representadas pela cor azul) eluem logo.

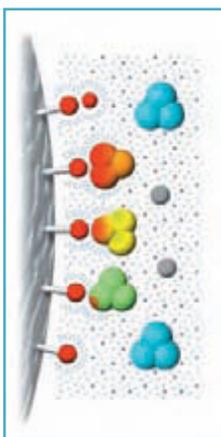



Figura 6 Cromatografia de interacção hidrofóbica.
Adaptado de Affinity Chromatography Principles and Methods

A adsorção da proteína ao ligando e a consequente eluição da mesma dependem da elevada ou baixa concentração de sal que se utilize. Em geral, as proteínas ligam-se às colunas de HIC a elevadas concentrações de sulfato de amónio, eluíndo através da diminuição da força iónica, enfraquecendo deste modo a interacção hidrofóbica [84,85]. Estas interacções são promovidas principalmente pelas forças de van der Waals [86].

A exigência de uma elevada concentração de sal é muitas vezes vista como uma desvantagem, especialmente no que diz respeito à aplicação industrial deste método, porque o uso do sal está associado a elevados custos e a um maior impacto ambiental [84,85]. Embora o sulfato de amónio seja o sal mais utilizado na HIC, outros sais como o glutamato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de guanidino, aspartato de sódio e cloreto de sódio, também são utilizados [87]. O desenvolvimento de grande variedade de fases estacionárias para HIC tem proporcionado um aumento da aplicação desta cromatografia como passo final de purificação, para remover contaminantes de amostras quase puras, o que poderá ser extremamente útil na purificação de biomoléculas como proteínas terapêuticas, DNA, agentes pirogénicos nomeadamente endotoxinas, proteínas séricas, proteínas nucleares, hormonas, proteínas recombinantes e enzimas [88-92].

A purificação de plasmídeos usando a cromatografia de interacção hidrofóbica tem por base de separação as diferenças de hidrofobicidade do pDNA e das impurezas, RNA e gDNA desnaturado. Através de matrizes derivatizadas com ligandos hidrofóbicos e usando um eluente de elevada força iónica, é possível eluir e separar em primeiro lugar pDNA na conformação sc e oc de RNA, gDNA, endotoxinas, formas de plasmídeo desnaturado e oligonucleótidos [83]. Basicamente a HIC tira vantagem da elevada hidrofobicidade das cadeias simples de ácidos nucleicos (elevada exposição das bases aromáticas hidrofóbicas) quando comparadas com as cadeias duplas de ácidos nucleicos. Nas cadeias duplas das moléculas de plasmídeo, as bases aromáticas estão protegidas no interior da hélice diminuindo a interacção com o suporte da HIC [83, 93-95]. Assim, a retenção de ácidos nucleícos por HIC é afectada principalmente pelo tamanho, composição e estrutura [96]. Exemplos bem sucedidos da aplicação de HIC incluem a purificação de um vector de terapia génica para a fibrose cística [83] e de uma vacina de DNA contra a raiva [14], bem como o desenvolvimento e a aplicação de métodos analíticos [97,98].

I.6.2 Cromatografia de fase reversa

A cromatografia de fase reversa tem como base de separação a hidrofobicidade da biomolécula, tal como a cromatografia de interacção hidrofóbica, diferindo desta na densidade de ligandos hidrofóbicos ligados à matriz e, consequentemente, uma interacção mais forte com a matriz. Assim, a cromatografia de fase reversa é preferível para moléculas pequenas ou péptidos em que não hajam problemas de desnaturação, ao passo que a cromatografia de interacção hidrofóbica usa-se para proteínas maiores em que a ligação mais fraca à matriz e as condições mais suaves de eluição previnem a desnaturação e conduzem a recuperações mais elevadas [5]. Como a figura 7 mostra, as moléculas mais hidrofóbicas e de menor densidade ficam retidas na matriz, ao passo que as menos hidrofóbicas e de maior densidade eluem.

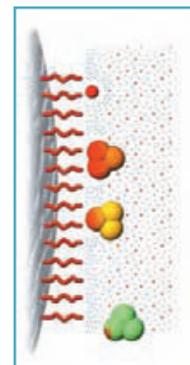



Figura 7 Cromatografia de fase reversa.

Adaptado de Affinity Chromatography Principles and Methods

A cromatografia de fase reversa tornou-se também uma ferramenta analítica essencial no controlo de processo de purificação de produtos farmacêuticos. As biomoléculas são eluídas através da aplicação de gradientes com solventes orgânicos, como acetonitrilo, metanol ou n-propanol, de polaridade decrescentes. Os solutos são eluidos por ordem decrescente de polaridade ou hidrofobicidade crescente [99,100]. Quando a molécula alvo é polar, como é o caso dos ácidos nucleicos, são adicionados ao eluente da coluna iões orgânicos, cuja função consiste em estabilizar as interacções iónicas das moléculas de plasmídeo, formando pares de iões hidrofóbicos não polares que se ligam à resina de fase reversa [101]. Algumas limitações desta técnica são o consumo elevado de solventes orgânicos, precauções que têm de ser tomadas no seu manuseamento e a utilização de misturas orgânicas para eluir as moléculas de plasmídeo [5].

I.6.3 Cromatografia de filtração em gel

A separação de bioprodutos por cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular (SEC) é obtida pelas diferenças de tamanho das biomoléculas que se pretendem separar, não havendo interacção destas com a matriz cromatográfica. A amostra e a fase móvel são aplicadas na coluna e, as moléculas mais pequenas difundem-se nos poros da matriz ficando retidas. À medida que a fase móvel passa

através da coluna, as moléculas que são maiores que os poros da matriz são incapazes de se difundir nestes e passam através da coluna (figura 8). No entanto, a separação por SEC depende não só do tamanho mas também da conformação das biomoléculas.

Apesar de poder ser utilizada em qualquer passo do processo de isolamento e purificação, é normalmente usada no princípio do processo para dessalinização da solução quando necessário, ou no fim, como passo de polimento final [5]. A principal vantagem é que este tipo de cromatografia pode ser utilizada para a purificação de todo o tipo de proteínas em que a separação procede sob condições de eluição isocrática sem interacções moleculares entre proteínas e a fase estacionária, garantindo deste modo que a proteína purificada conserva a sua bioactividade. É usada como técnica para determinação do peso molecular de proteínas podendo também ser aplicada para a renaturação de proteínas. Esta técnica permite uma transferência eficiente de bioprodutos para um novo solvente, no entanto, o processo envolve sempre diluição da amostra, pelo que implica um passo de concentração adicional [102].

Figura 8 Cromatografia de filtração em gel.
Adaptado de Affinity Chromatography Principles and Methods

Para uma SEC ideal, não existe qualquer interacção entre as proteínas e a fase estacionária, mas na prática, existem algumas interacções selectivas, resultando não só na retenção parcial de proteínas como também numa redução da recuperação mássica ou bioactividade de proteínas recombinantes (rPRT). As eventuais interacções inespecíficas podem ser minimizadas por adição de uma baixa concentração de NaCl ou de arginina como foi recentemente descrito [103]. Ao utilizar NaCl ou fosfato em concentrações moderadas induz um aumento de força iónica, reduzindo deste modo interacções electrostáticas entre proteínas e as colunas [104]. No entanto, o uso de elevadas concentrações podem também aumentar as interacções hidrofóbicas entre as proteínas e a matriz. A inclusão de ureia ou de solventes orgânicos é outra abordagem que deverá enfraquecer as interacções hidrofóbicas, mas também irá aumentar as interacções iónicas e pH extremos têm sido utilizados para melhorar a separação por SEC [105,106]. Cada uma destas condições pode alterar a conformação proteica ou estado de agregação, induzindo conclusões erradas que não reflectem o estado actual das proteínas.

No entanto a capacidade de resolução da SEC é limitada [107], e no caso dos plasmídeos o isolamento da isoforma superenrolada de plasmídeos numa única etapa é difícil [96]. Neste tipo de cromatografia os plasmídeos são fraccionados e purificados com base no seu tamanho e conformação. Esta técnica é ideal como operação final de um processo completo de purificação, uma vez que permite a remoção de contaminantes residuais (RNA e gDNA caso o peso molecular do gDNA seja diferente do pDNA), a separação parcial da isoforma superenrolada da circular aberta, uma redução substancial dos níveis de endotoxinas [57] e coloca o plasmídeo numa solução com uma formulação mais adequada. Este tipo de cromatografia é de capacidade limitada, dilui 2 a 3 vezes o plasmídeo [108] e apenas alguns géis apresentam uma selectividade adequada para serem utilizados na purificação de plasmídeos.

I.6.4 Cromatografia de troca iónica

A cromatografia de troca iónica é uma técnica cromatográfica usada na purificação de proteínas em grande escala cujo conceito básico se baseia na separação de moléculas com base na sua carga. As moléculas com cargas diferentes são retidas de modo distinto. Neste tipo de cromatografia, existe uma interacção iónica entre a biomolécula e o suporte. A força de ligação que se estabelece entre a biomolécula e o suporte é determinada pela força iónica da fase móvel e pelo número de interacções entre os grupos iónicos da proteína e do suporte.

A eluição fraccionada das biomoléculas é conseguida através da aplicação de um gradiente de força iónica, de pH ou de ambos. Este tipo de cromatografia pode ser utilizada após a separação das células ou dos fragmentos celulares (produto intracelular). A cromatografia de troca iónica é usada na purificação, para um grande número de antibióticos, aminoácidos e proteínas de fermentações e cultura de células [5].

A cromatografia de troca aniónica (AEX) continua a ser uma das técnicas mais utilizadas para a captação, purificação e quantificação do pDNA, possuindo as vantagens de uma rápida análise e separação, não requer a utilização de solventes orgânicos, regeneração simples com hidróxido de sódio e da grande disponibilidade comercial de fases estacionárias [10]. Estes factores contribuíram para a popularidade da utilização da AEX para purificar pDNA [109], tanto numa escala preparativa como analítica [9].

A estrutura polianiónica do DNA plasmídico pode ser explorada por este tipo de cromatografia usando ligandos fortes de troca aniónica [51] como aminas quaternárias acoplados a matrizes poliméricas [110]. A AEX baseia-se na interacção dos grupos fosfatos do DNA carregados negativamente com uma fase estacionária com ligandos carregados positivamente [110]. Após ligação, um gradiente de sal é utilizado para quebrar as ligações dos ácidos nucleicos com a coluna e eluir os diferentes ácidos nucleicos na ordem crescente da sua densidade de carga, uma propriedade que, por sua vez é função do comprimento e da conformação da cadeia [34,110] (figura 9). A carga global do pDNA depende do número de bases azotadas que compõem a molécula [51] e, em alguns casos, a composição e sequência de bases afectam a eluição padrão de ácidos nucleícos na troca aniónica [111].

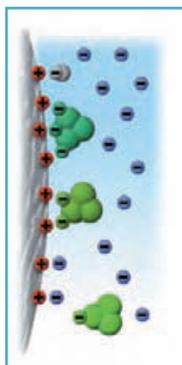



Figura 9 Cromatografia de troca aniónica.
Adaptado de Affinity Chromatography Principles and Methods

A separação das diferentes isoformas do pDNA por troca aniónica, principalmente as isoformas oc e sc, confirma a hipótese da retenção dependente da conformação [44,112,113], sendo a isoforma sc do pDNA mais retida devido à maior compactação e densidade de carga do que a isoforma oc [110,114]. Quando se utiliza este tipo de cromatografia para separar o pDNA, o lisado clarificado deve ser aplicado numa concentração de NaCl suficientemente elevada de modo a evitar a ligação de impurezas. Sob estas condições, uma quantidade significativa de impurezas eluem imediatamente e a capacidade pode ser aproveitada para a adsorção do pDNA [109,114]. Moléculas com elevada densidade, como as isoformas do pDNA, são retidas e posteriormente eluídas através do aumento da força iónica da fase móvel. Muitas fases estacionárias da AEX têm uma fraca selectividade para a separação de pDNA e impurezas devido à similaridade dos contaminantes do pDNA em termos de estrutura e composição química (gDNA, RNA) ou carga (endotoxinas) e a separação pode ser insuficiente em alguns casos [42,109]. Esta falta de selectividade torna a purificação do pDNA muito difícil de conseguir num único passo [96]. Na maior parte dos casos, é necessário um segundo passo cromatográfico ou passos de pré-purificação para obter o grau de pureza exigido.

I.6.5 Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade (AC) desempenha um papel poderoso na separação biotecnológica, usa ligandos bioespecíficos para isolar e/ou purificar biomoléculas com base na sua função biológica ou estrutura química, preservando deste modo a actividade biológica das biomoléculas [115-117]. De todas as técnicas de purificação usadas correntemente, a AC é considerada como sendo a mais selectiva [82,115,118-121]. Permite a separação de biomoléculas com base numa interacção reversível entre a biomolécula alvo e um ligando específico ligado a uma matriz cromatográfica (figura 10). As interacções específicas que ocorrem entre os ligandos imobilizados na matriz e a molécula-alvo são resultado de interacções electrostáticas, interacções hidrofóbicas, forças de Van der Walls e / ou ligações de hidrogénio [122].

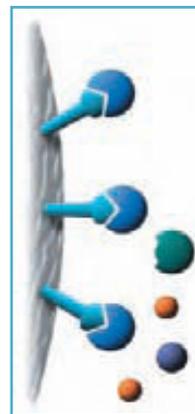



Figura 10 Cromatografia de afinidade.

Adaptado de Affinity Chromatography Principles and Methods

Quando a amostra que contém as biomoléculas alvo é aplicada na coluna, ocorre uma captura selectiva dessas biomoléculas pelo ligando, uma vez que ocorrem condições que favorecem a ligação específica para com o ligando imobilizado na matriz. As moléculas não retidas são removidas visto estarem fracamente ligadas e a molécula de interesse fica imobilizada, podendo ser recuperada alterando as condições do processo que favoreçam a sua eluição [115] (figura 11). O processo de eluição pode ser realizado tanto especificamente, utilizando componentes competitivos, como não especificamente, através da alteração do pH, força iónica ou polaridade dependendo da matriz utilizada e das características químicas das biomoléculas [122].

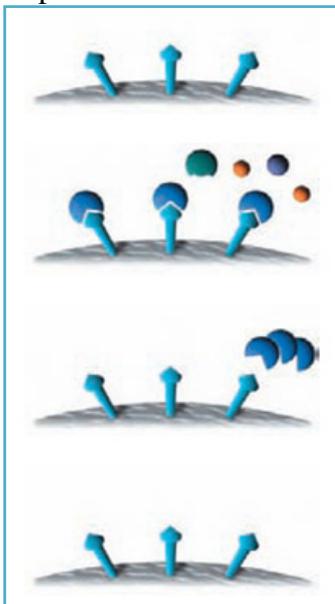



Figura 11 Mecanismo de purificação por afinidade.

Adaptado de Affinity Chromatography Principles and Methods

No entanto, o desenvolvimento deste tipo de cromatografia pode ser difícil caso a eluição do produto seja alcançada sob condições extremas [123].

Os ligandos são normalmente ligados covalentemente a um suporte sólido, como por exemplo agarose, têm origens e natureza diferentes com a propriedade de formarem um complexo específico e reversível com a biomolécula a ser separada, ocupando assim um papel muito importante no sucesso de uma purificação por afinidade. Podem ser compostos de elevado peso molecular, como inibidores de enzimas, e compostos de baixo peso molecular, como análogos de substrato. Os corantes têm uma interacção de afinidade mais geral, sendo utilizados frequentemente em investigação e usados na purificação de β-interferão [5]. Um ligando ideal deve possuir propriedades adequadas de modo que o pDNA possa ficar retido, eluíndo posteriormente [123]. Existem dois tipos de ligandos, os bioespecíficos e os sintéticos. Os bioespecíficos apesar de serem extremamente específicos em determinados casos, são bastante caros, requerem muitas vezes uma pré-purificação, são instáveis química e biologicamente e tendem a ser difíceis de imobilizar sem alterar a sua actividade e as suas propriedades biológicas originais. Exemplos deste tipo de ligandos são os nucleótidos como a adenosina-trifosfato (ATP), heparina, lectinas, DNA, RNA, Vitamina A e imunoglobulina G (IgG) [124,125]. Como estes ligandos tendem a ser frágeis e estão associados a baixas capacidades de ligação, uma nova abordagem visa a concepção de ligandos sintéticos que possam combinar a selectividade de ligandos naturais com uma elevada capacidade e durabilidade dos sistemas sintéticos [115,120]. Assim, a substituição dos ligandos naturais por ligandos sintéticos oferece um modo de ultrapassar estas dificuldades, uma vez que estes encontram-se disponíveis comercialmente numa grande variedade, são muito mais baratos, são facilmente imobilizados, especialmente em matrizes que possuem grupos hidroxilo e são resistentes à degradação biológica [118].

A alta selectividade da ligação por afinidade é uma proposta atractiva para a purificação de biofármacos, como o pDNA. Têm sido descritas abordagens de afinidade para a purificação do pDNA utilizando oligonucleotídeos imobilizados para formar uma hélice tripla [126,127]. Apesar da elevada selectividade, este método é geralmente caracterizado pela fraca ligação cinética e é limitado para sequências de bases específicas de DNA, aumentando assim os custos.

É possível desenhar e criar ligandos de afinidade estáveis capazes de discriminar e de se ligarem selectivamente a biomoléculas alvo na presença de impurezas. Varley e seus

colaboradores mostraram que um ligando com uma constante de dissociação optimizada facilita a purificação do pDNA por AC. A constante de dissociação optimizada para mecanismos de ligação por afinidade para uso num sistema cromatográfico é de $10^{-6}M^{-1}$ a $10^{-8}M^{-1}$. Se a constante for superior a este valor, os contaminantes podem ser co-purificados, tornando o mecanismo insuficientemente selectivo para o alvo. Caso a constante seja baixa, o rendimento da ligação é baixo. Os actuais sistemas de purificação industriais normalmente utilizam várias etapas de filtração e três etapas cromatográficas, exigindo um rendimento de pelo menos 90 % [58].

Uma purificação fiável por afinidade exige não só ligandos optimizados mas também a selecção de uma matriz estacionária adequada [128] nomeadamente a natureza e activação da matriz, as propriedades do braço espaçador e mecanismos de imobilização de ligandos [129]. A escolha da matriz e as condições a serem utilizadas dependerá das propriedades moleculares, da natureza físico-químicas e termodinâmicas das biomoléculas [130,131]. Uma matriz deverá apresentar grupos funcionais à superfície (hidroxilo, carboxilo, amida, etc) para uma melhor derivatização e imobilização dos ligandos; ter adsorções não específicas muito reduzidas; ser preferencialmente hidrofílica para reduzir as adsorções não específicas e para permitir o uso de meios aquosos; ser estável física e quimicamente sob uma grande variedade de condições como pH, temperatura e solventes; ser facilmente empacotável na coluna e ser altamente porosa, de modo a permitir quantidades elevadas de imobilização de ligandos, aumentando deste modo a capacidade de adsorção. Os poros devem ser largos uma vez que, na maioria dos casos, tanto os ligandos como as moléculas a separar são de tamanho grande [82,125]. Se o tamanho dos poros da matriz for demasiado pequeno, a ligação do pDNA será restrito devido à falta de acessibilidade dos ligandos na matriz [45,128].

Utilizando condições de imobilização e ligandos adequados obtêm-se separações superiores às obtidas por cromatografia de fase reversa ou troca iónica. A interacção bioespecífica permite isolar um componente a partir de soluções muito diluídas e misturas complexas [5]. O seu uso tem vantagem, particularmente, na purificação de proteínas terapêuticas, permitindo um grau de pureza elevado num número reduzido de passos e rendimentos superiores às técnicas cromatográficas convencionais [115]. Esta técnica apresenta outras vantagens tais como a possibilidade de reutilização e a facilidade de armazenamento seco do gel [132]. Contudo, este método também

apresenta algumas limitações, sobretudo no que diz respeito à origem biológica dos ligandos [115].

A alta selectividade e resolução desta técnica torna-a capaz de purificar num único passo (figura 12) e a recuperação do material activo é bastante elevada [133].

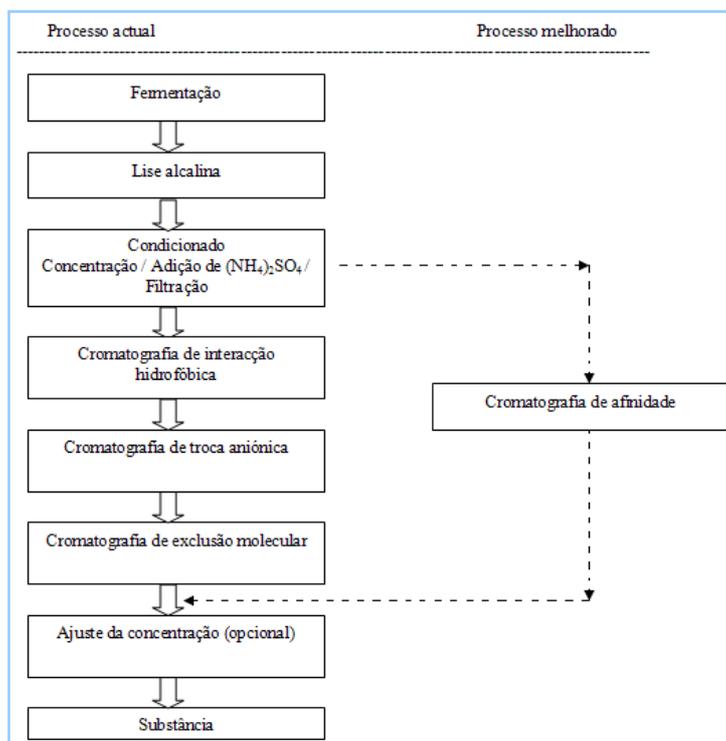



Figura 12 Processos para a purificação do pDNA. Adaptado de Han *et al.,* (2008)

Para que o ligando seja estável precisa de estar covalentemente ligado à matriz por algum grupo funcional que possa ser fácil e convenientemente derivatizado na sua preparação. A activação é definida como um processo de modificação química da matriz, de modo que o produto resultante reaja formando uma ligação covalente com o ligando escolhido. Esta ligação deve ser efectuada num sítio de modo que não afecte as interacções específicas entre o ligando imobilizado e as moléculas alvo. Deste modo, a ligação nunca pode ser efectuada pelo sítio activo, mas sim por um sítio pouco crítico. Utilizam-se frequentemente cadeias espaçadoras e moléculas de baixo peso molecular, que são introduzidas entre a matriz e o ligando, com o intuito de aumentar a acessibilidade do ligando às macromoléculas com as quais deve interactuar, uma vez que, os sítios activos de muitas substâncias biológicas estão localizados profundamente dentro da molécula [123].

Relativamente à activação da matriz, são referidos vários processos sendo os mais utilizados os métodos que empregam o brometo de cianogénio, epóxidos, carbonildiimidazóis, cloreto de *p*-toluenossulfonilo, divinilsulfonas e cloreto de cianúrilo [115,125,134].

I.6.5.1 Cromatografia de afinidade com metais imobilizados

A cromatografia de afinidade com metais imobilizados (IMAC) favorece as interacções de afinidade entre os iões metálicos (imobilizados num suporte através de compostos quelantes) e as moléculas alvo, de modo a permitir uma separação eficiente entre as moléculas alvo e outros compostos presentes numa mistura [135].

O princípio da IMAC baseia-se no facto de que os metais de transição (Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} e Co^{2+}) poderem coordenar com alguns aminoácidos tais como a histidina, cisteína e triptofano, através dos grupos dadores de electrões nas cadeias laterais desses aminoácidos. A utilização destas interacções para fins cromatográficos requer que o ião metálico seja imobilizado num suporte insolúvel. Esta imobilização pode ser efectuada ligando um grupo quelante à matriz cromatográfica. Existem vários agentes quelantes usados no IMAC sendo o ácido iminodiacético (IDA) o mais utilizado. Este composto pode ser acoplado a várias matrizes cromatográficas nomeadamente a Sepharose 6B, Sepharose 4B ou Sephadex G-100 através de um longo braço espaçador hidrófilo [136].

A cromatografia de afinidade com metal imobilizado foi recentemente aplicada para a purificação do pDNA, utilizando uma resina do IDA carregada com Cu^{2+} [137]. Foi citado que as matrizes de IMAC foram capazes de adsorver selectivamente ácidos nucleicos de cadeia simples através de interacções de iões metálicos com bases azotadas [137] especialmente as que estão presentes nas purinas (adenina e guanina) [138]**,** enquanto que o pDNA e gDNA mostraram baixa afinidade de ligação para a IMAC [137]. Segundo vários estudos, este tipo de cromatografia tem viabilidade para purificar pDNA directamente a partir de um lisado celular alcalino [139]. Tan e colaboradores (2007) revelaram que a cromatografia de afinidade com metal imobilizado, em particular Cu^{2+}-IDA e Ni^{2+}-IDA, é altamente eficiente na remoção directa de RNA e endotoxinas do lisado celular [137].

A inacessibilidade das bases azotadas aromáticas do pDNA imobilizado em iões metálicos dificulta a sua interacção com qualquer matriz de IMAC, ao passo que, a

flexibilidade das endotoxinas induzem elevadas interacções de afinidade para todos os metais de transição testados [139]. Deste modo, a preferência de interacção de afinidade com o metal imobilizado segue a seguinte ordem: endotoxina > RNA > pDNA. É de referir que, as interacções diferenciais entre o pDNA e RNA podem ser atribuidas às propriedades dos ácidos nucleicos, iões metálicos e compostos quelantes.

I.6.5.2. Cromatografia de afinidade por hélice tripla

A tecnologia da hélice tripla proporciona um amplo leque de possibilidades para aplicações terapêuticas devido à simplicidade do princípio geral da mesma [140].

A cromatografia de afinidade por hélice tripla (THAC) baseia-se na formação de uma hélice tripla entre um oligonucleotido ligado covalentemente a uma matriz cromatográfica e uma sequência de dupla cadeia presente no pDNA a ser purificado. O oligonucleótido pirimidina que é usado como ligando, liga-se ao maior espaço na hélice da dupla cadeia de DNA através da formação de pontes de hidrogénio de Hoogsteen: a timina (T) reconhece especificamente a adenina (A) formando o tripleto TA-T, assim como a citosina protonada reconhece especificamente a guanina (G+) para formar o tripleto CG-C+ [141].

O interesse das hélices triplas aumentou significativamente com a descoberta de uma estrutura com cadeia tripla chamada H-DNA, que é responsável por uma forma super-helicoidal nos plasmídeos [142]. Segundo um estudo sobre a purificação do plasmídeo pXL2563, Wils e colaboradores (1997) verificaram que é possível purificar este plasmídeo através desta técnica cromatográfica, como também reduzir os níveis de contaminação de RNA, gDNA e endotoxinas num único passo. Neste plasmídeo, há formação de uma hélice tripla entre um oligonucleótido poly-CTT e as correspondentes sequências alvo poly-GAA presentes no plasmídeo [143].

I.6.5.3. Cromatografia de afinidade DNA - proteína

As interacções DNA-proteína têm sido exploradas na cromatografia de afinidade para purificar pDNA. Para que as proteínas actuem como ligandos com especificidade para pDNA necessitam de se ligar a sequências específicas do DNA. As proteínas de "dedo de zinco" (ZF) são a classe de proteínas mais conhecidas que se ligam às sequências alvo do DNA com uma boa especificidade através de um mecanismo molecular

conhecido [144]. Segundo um estudo efectuado por Laity e colaboradores (2001), as proteínas inicialmente ligam-se não especificamente por interacções electrostáticas e posteriormente movem-se até reconhecer o sítio onde ligam especificamente [145]. Na verdade, a proteína ZF demonstrou que actua como um ligando de afinidade eficaz para o isolamento do pDNA directamente a partir de lisados celulares clarificados. A especificidade da sequência do DNA para esta proteína ZF foi demonstrada anteriormente e é tal que o plasmídeo que contém as sequências alvo pode ser isolado, enquanto que outro plasmídeo que partilha 7 pares de bases (pb) das 9 pb da sequência de reconhecimento não é reconhecido [146]. Nesta experiência, a proteína ZF foi fundida com a glutationa – S – transferase (GST – ZnF) e imobilizada em Sepharose. O baixo rendimento obtido foi atribuído ao restrito acesso e mobilidade da proteína de fusão na matriz de Sepharose.

I.6.5.4.Cromatografia de afinidade DNA - aminoácidos

A AC baseada em aminoácidos representa uma abordagem promissora uma vez que combina a selectividade de uma interacção biológica com a simplicidade de uma pequena molécula baseadas em aminoácidos [147].

Vijayalakshmi *et al*., foram os primeiros investigadores a utilizarem pequenos ligandos moleculares para a purificação de imunoglobulinas e para uma variedade de proteínas [148]. Mas, o conceito de utilizar ligandos menos selectivos tem sido aplicado para a purificação do pDNA, nomeadamente usando a histidina e arginina como ligandos imobilizados que, como previsto por estudos atómicos, interagem preferencialmente com bases específicas de ácidos nucleícos [149,150]. Os suportes cromatográficos e as membranas derivatizadas com histidina foram utilizados pela primeira vez para a purificação de proteínas [116,151] e oligossacarídeos [152]. No caso da purificação de pDNA e, segundo Sousa e colaboradores apenas a isoforma sc do pDNA interage com a histidina observando-se a ocorrência de interacções hidrofóbicas e ligações por pontes de hidrogénio entre a histidina e as bases do DNA [153]. Devido à estrutura da isoforma sc as bases desta ficam mais expostas que as bases da isoforma oc do pDNA, facilitando deste modo as interacções específicas com a histidina.

Ao utilizar um gradiente de sal adequado, a isoforma oc elui ao passo que a isoforma sc do pDNA interage com a histidina. Esta ligação pode ser uma consequência de

deformações induzidas pela torção da cadeia da isoforma sc, na qual expõe algumas bases tornando-as disponíveis para interagir com a histidina [153].

Trabalhos efectuados com a arginina demonstraram que esta ao actuar como ligando também reconhece e separa eficientemente as isoformas sc e oc do pDNA. Estudos efectuados que usaram matrizes de arginina para purificar pDNA revelaram a presença de interacções específicas com o plasmídeo e, mais importante ainda, um reconhecimento significativo da isoforma sc. O mecanismo subjacente envolve não só interacções electrostáticas e hidrofóbicas entre o suporte e a molécula de pDNA mas também o bioreconhecimento das bases dos ácidos nucleicos através da arginina. Estes mecanismos de reconhecimento específico devem-se em parte às características da arginina, nomeadamente à sua capacidade para interagir nas diferentes conformações, ao comprimento da cadeia, entre outras [154].

Comparando os mecanismos de purificação da isoforma sc do pDNA utilizando a histidina e arginina como ligandos imobilizados, constata-se que na histidina a interacção foi atribuída à exposição de bases [155], ao passo que na matriz de arginina-agarose o pDNA liga-se a baixas forças iónicas, indicando a presença de interacções fortes com os grupos fosfato carregados do pDNA. A elevada resolução obtida neste estudo e a utilização de baixas concentrações de sal indicam que este método pode ser promissor para isolar a isoforma sc do pDNA numa escala preparativa ou analítica.

Como os aminoácidos promovem interacções específicas com os ácidos nucleicos, há a necessidade de desenvolver novos ligandos para compreender melhor a natureza das interacções envolvidas neste mecanismo, de modo a conhecer o fenómeno que ocorre entre o reconhecimento dos aminoácidos e dos ácidos nucleicos.

CAPÍTULO II

(Parte Experimental)

II.1. Material e métodos

II.1. 1. O plasmídeo pVAX1-LacZ

Devem-se ter cuidados especiais com a escolha de uma espécie como hospedeira de um plasmídeo, de maneira a obter bons rendimentos e a prevenir alguns problemas em etapas posteriores, como a purificação. Assim, a espécie deve ser escolhida por forma a minimizar a quantidade de impurezas que necessitam ser removidas [52]. Em geral, deve ser escolhida uma espécie hospedeira que tenha sido completamente caracterizada, que esteja livre de qualquer contaminação e que não seja prejudicial para o ambiente, para o produto final, para os pacientes e para as pessoas que estão envolvidas na produção e manipulação [156]. A bactéria *E. coli* é considerada como um hospedeiro ideal, pois ao longo da história científica tem reconhecida segurança na utilização em produtos farmacêuticos [157,158].

O microrganismo utilizado neste estudo foi a estirpe de *E. coli* DH5α contendo o plasmídeo pVAX1- *Lac*Z (Invitrogen). Este plasmídeo contém 6050 pares de bases e possui o gene de resistência à canamicina como marca selectiva (figura 13).

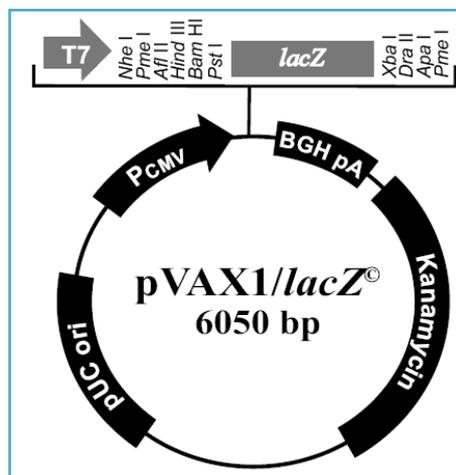



Figura 13 Representação esquemática do plasmídeo pVAX1- *Lac*Z.

II. 1. 2. Reagentes

Nas tabelas seguintes apresentam-se respectivamente os vários tipos de matrizes e reagentes utilizados durante a realização deste trabalho experimental, bem como os respectivos fornecedores.

Tabela 1 Tipos de matrizes utilizadas

Arginina e derivados	**Histidina e derivados**
Arginina - Sepharose	Histidina - Sepharose
Éster metílico da arginina - Sepharose	Éster metílico da histidina - Sepharose
Éster etílico da arginina – Sepharose	---
Éster butílico da arginina - Sepharose	---
Éster hexílico da arginina - Sepharose	---
Éster octílico da arginina - Sepharose	--

Tabela 2 Lista dos reagentes utilizados no decorrer do trabalho laboratorial

Reagentes	**Fornecedor, País**
Sepharose	Seaken, UK
Brometo de etídeo	Sigma, Espanha
Extracto de levedura	Sigma – Aldrich, Espanha
Glicerol	Sigma – Aldrich, Espanha
Meio LB-Agar	Conda Micro & Molecular Biology, Espanha
Triptona	Panreac Química SA, Espanha
Tris-HCl	Sigma, Espanha
Cloreto de sódio	Panreac Química SAU, Espanha
Sulfato de amónio	Panreac Química SAU, Espanha
Isopropanol	Panreac Química SAU, Espanha

II.1. 3. Equipamentos

Ao longo do trabalho experimental, para além do material corrente de laboratório foram utilizados os seguintes equipamentos:

Agitador orbital: O crescimento celular da pré-fermentação e da fermentação foi realizado num agitador orbital à temperatura de 37ºC com 250 rotações por minuto (rpm).

Autoclave: para esterilização dos utensílios e meios necessários à realização do trabalho foi utilizada uma autoclave Uniclave 88.

Balança: a pesagem de todos os reagentes foi realizada numa balança analítica ADD 110/L

Centrífugas: As centrifugações efectuadas para o isolamento e lise das fermentações foram realizadas numa centrífuga Sigma, modelo 3-18K e na ultracentrifuga Optima L-100 x P. Para concentrar e/ou diluir as amostras utilizou-se a centrífuga Heraeus Multifuge, modelo 1S-R.

Espectrofotómetro UV/Vis: A medição dos valores das absorvências das amostras bem como o controlo do crescimento celular das fermentações foram realizadas num espectrofotómetro Ultrospec, modelo UV/Visível 3000. A concentração dos ácidos nucleícos foi lida a um comprimento de onda de 260 nm, e as amostras provenientes da fermentação foram lidas a 600 nm.

Estufa: a incubação das placas para o crescimento da estirpe foi efectuada numa estufa PSelecta a 37ºC.

Potenciómetro: o pH das soluções foi medido num potenciómetro 744 pH-Meter da Metrohm.

Vórtex: durante a lise celular, a homogeneização das amostras foi feita num Vórtex Mixer 230V da Labnet.

II. 2. Procedimento Experimental

II.2.1. Fermentação de uma estirpe recombinante de E. coli DH5α contendo o plasmídeo pVAX1-LacZ (6,05 Kpb)

- Preparação dos meios

Prepararam-se os meios necessários para se poder efectuar a fermentação, nomeadamente o meio TB (Terrific Broth, meio líquido) e o meio LB-Agar (Luria Bertani, meio sólido) (tabela 3).

Tabela 3 Composição dos meios

Meio	Triptona % (p/v)	Extracto de levedura % (p/v)	Sais (K_2HPO_4 + KH_2PO_4) (mL)	Glicerol (mM)	Água (mL)	LB-Agar (g/L)
Meio TB	1,2	2,4	30	55	248	-
Meio LB-Agar	-	-	-	-	100	35

➢ Pré-fermentação

As fermentações realizadas, foram iniciadas a partir de uma pré-cultura preparada em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura TB e 50 µL de canamicina, que foi inoculada a partir de uma colónia que cresceu durante a noite à temperatura de 37ºC em placas de LB-agar (35 g/L). O crescimento da pré-fermentação foi realizado num agitador orbital à referida temperatura e a 250 rpm durante aproximadamente 3 horas. Quando se atingiu uma densidade óptica a 600 nm de 2,6 iniciaram-se as fermentações a partir de um volume apropriado da pré-cultura, determinado a partir da seguinte expressão:

$$D.O_{\text{pré-inóculo}} \times V_{\text{retirar do pré-inóculo}} = (V_{\text{retirar do pré-inóculo}} \times V_{\text{fermentação}}) \times D.O$$

Em que:

D.O = 0,2

➢ Fermentação

As fermentações para a produção do plasmídeo decorreram à temperatura de 37ºC, e a 250 rpm, em erlenmeyers de 1000 mL contendo um volume total de 250 mL do meio líquido com uma concentração de canamicina de 250 µL. A fermentação foi parada a meio da fase exponencial para uma densidade óptica a 600 nm entre 10 e 12 . As células foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 5000G durante 20 minutos e à temperatura de 4ºC.

II.2.2. Lise celular do DNA plasmídico usando o kit Qiagen (Maxi)

O pDNA foi isolado das células segundo o protocolo descrito no kit Qiagen (Maxi). O "pellet" de células obtido foi ressuspenso em 5 mL de tampão P1 (tabela 4) e após a obtenção de uma solução homogénea, distribuiu-se a mesma quantidade do extracto anterior para tubos de centrífuga. De seguida adicionaram-se 2,5 mL de tampão P2 (tabela 4) nas paredes dos tubos visto que já estava decorrer lise e homogeneizaram-se os tubos invertendo-os cuidadosamente 4-6 vezes. Posteriormente incubaram-se os tubos à temperatura ambiente durante 5 minutos e adicionaram-se 2,5 mL de tampão P3 (tabela 4). Homogeneizaram-se os tubos invertendo-os cuidadosamente 4-6 vezes e posteriormente colocaram-se no gelo durante 20 minutos. O lisado obtido foi clarificado por centrifugação durante 30 minutos a 10500 rpm e a 4ºC e o sobrenadante resultante foi transferido para novos tubos de centrifuga. Recentrifugou-se novamente o lisado durante 15 minutos, à mesma velocidade e temperatura com o objectivo de se obter uma solução clarificada.

Para proceder a uma pré-purificação do pDNA preparou-se uma coluna aniónica e equilibrou-se adicionando 10 mL de tampão QBT (tabela 4). Após centrifugação adicionou-se o sobrenadante directamente na coluna e esta foi lavada duas vezes com 30 mL de tampão QC (tabela 4). Posteriormente colocou-se um tubo de centrifuga no gelo e eluiu-se o pDNA adicionando 15 mL de tampão QF (tabela 4).

Tabela 4 Composição dos tampões utilizados na lise celular

Tampão	Composição	Armazenamento
P1 (Tampão de ressuspensão)	50 mM Tris-HCl, pH=8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A	2-8ºC, após a adição de RNase A
P2 (Tampão lise)	200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)	15-25 ºC
P3 (Tampão de neutralização)	3,0 M acetato de potássio, pH=5,5	15-25 ºC ou 2-8 ºC
QBT (Tampão de equilibrio)	750 mM NaCl: 50 mM MOPS, pH =7,0; 15 % isopropanol (v/v); 0,15% Triton X-100 (v/v)	15-25 ºC
QC (Tampão de lavagem)	1,0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH =7,0; 15 % isopropanol (v/v)	15-25 ºC
QF (Tampão de eluição)	1.25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH=8,5; 15 % isopropanol (v/v)	15-25 ºC

Precipitou-se o pDNA adicionando 3,5 mL de isopropanol a cada tubo e homogeneizaram-se os tubos até ficar tudo homogéneo. O pDNA precipitado foi isolado por centrifugação durante 30 minutos a 9300 rpm e a 4ºC, sendo redissolvido em 1 mL de Tris-HCl (10 mM, pH=8,0).

II.2.3. Cromatografia em mini-colunas de arginina, histidina e respectivos derivados

Montagem das minicolunas de arginina, histidina e dos seus respectivos derivados:

Em primeiro lugar lavaram-se as minicolunas com água destilada, adicionou-se um pouco da mesma água e aproximadamente 1 mL de cada matriz com a coluna fechada (tabela 1). Adicionou-se novamente água, esperou-se que gel sedimentasse e colocou-se o filtro. Por fim taparam-se as minicolunas.

II.2.4. Determinação da Absorvência

Os valores das absorvências foram lidos a um comprimento de onda de 260 nm, e concentração dos ácidos nucleícos foi efectuada sabendo que 1 unidade de Abs corresponde a 50 µg/mL.

II.2.5. Electroforese em gel de agarose

A electroforese em gel por acção de um campo eléctrico é frequentemente utilizada para separar e estimar o tamanho de fragmentos de ácidos nucleícos. Através da comparação da distância percorrida pelos fragmentos com a percorrida por fragmentos de peso molecular conhecido (padrões de peso molecular) é possível estimar o peso molecular de cada fragmento da amostra a analisar. A electroforese de DNA é normalmente realizada em gel de agarose. Quando sujeitos a um campo eléctrico, os ácidos nucleícos migram em direcção ao pólo positivo, uma vez que apresentam carga negativa a pH neutro. A agarose funciona como uma rede cujos poros deixam passar mais facilmente as moléculas mais pequenas, que vão portanto migrar mais do que as de maiores dimensões. A migração de um fragmento de DNA na forma circular, como é o caso de um plasmídeo não digerido, é diferente da migração do mesmo plasmídeo sob a forma linear. Por outro lado, moléculas com uma conformação mais compacta migram mais rapidamente do que moléculas com uma conformação molecular mais "relaxada". Na maior parte das preparações com plasmídeos não digeridos, é possível encontrar pelo menos duas formas topologicamente distintas de DNA, são elas: a forma oc e a forma sc, migrando esta última mais rapidamente do que a primeira. Para preparar o gel de agarose, fez-se a mistura de agarose (1%) com a solução tampão de TAE (40 mM Tris-

base, 20 mM de ácido acético e 1mM de EDTA, pH = 8,0). Após dissolução, colocou-se o brometo de etídio que permitiu a visualização das bandas de DNA por exposição à luz ultravioleta (UV). Quando a mistura arrefeceu, o gel polimerizou. Um detalhe importante é a colocação do pente no gel durante o endurecimento uma vez que, o pente cria poços que serão utilizados para a colocação das amostras. As amostras utilizadas neste trabalho experimental foram corridas com uma potência de 120 V utilizando a solução TAE como tampão de corrida. Por fim, os géis foram visualizados através de uma câmara cujo modelo é CV-A50C.

CAPÍTULO III

(Resultados e Discussão)

Alguns tipos de cromatografia de afinidade foram já implementados para a purificação de plasmídeos, como a IMAC, a THAC ou a cromatografia com proteína imobilizada, e mais recentemente uma nova abordagem de cromatografia de afinidade com aminoácidos imobilizados foi desenvolvida combinando a selectividade da interacção biológica e de ocorrência natural entre proteínas e DNA, com a utilização de aminoácidos como ligandos mais simples [147]. As estratégias de purificação de pDNA utilizando aminoácidos como ligandos imobilizados em matrizes cromatográficas produziram recentemente resultados interessantes, demonstrando que a purificação de pDNA para posterior aplicação terapêutica, nomeadamente terapia génica e vacinas de DNA é possível utilizando estas matrizes. Deste modo, este trabalho teve como principal objectivo o estudo do comportamento de suportes cromatográficos de afinidade usando aminoácidos e derivados como ligandos específicos para purificar o pDNA. Com a colaboração do grupo de orgânica procedeu-se à síntese e imobilização de derivados de aminoácidos de arginina e histidina em Sepharose, introduzindo vários grupos alquílicos no grupo carboxílico do aminoácido, por esterificação, de modo a estudar a influência na interacção com o pDNA. Para verificar as interacções que poderão ocorrer na ligação do pDNA à arginina e histidina, efectuaram-se várias experiências cromatográficas, realizadas em colunas de bancada, de modo a averiguar o comportamento do pDNA nas diferentes matrizes. Em primeiro lugar testaram-se as condições que favorecem a total ligação/eluição do pDNA a cada matriz e, dependendo da gama de concentrações estudada, procedeu-se ao estudo da separação das diferentes isoformas do pDNA, nomeadamente a isoforma oc e a isoforma sc. É de referir que os ensaios foram realizados utilizando gradiente por passos com diferentes concentrações de sais ($(NH_4)_2SO_4$ e NaCl).

III.1. Arginina e derivados

III. 1. 1. Síntese de derivados de L – Arginina

Os ésteres alquílicos da L-arginina **2** (figura 14) foram sintetizados por esterificação, seguindo métodos descritos ou adoptados da literatura [159]. Os ésteres foram preparados por adição da L-arginina **1** a uma solução, arrefecida a -10ºC, de cloreto de tionilo (1,5 equivalentes) com um excesso de álcool anidro (metanol, etanol, butanol, hexanol e octanol), seguido de aquecimento a 60-70ºC até o desaparecimento do aminoácido de partida (1-3h). Os ésteres **2** foram facilmente obtidos na forma de óleo, após remoção do excesso de cloreto de tionilo e do álcool por destilação, seguida por uma série de dissoluções/precipitações usando metanol e éter etílico. Os ésteres **2** também foram obtidos como bases livres sólidas **2’** após adição de solução de carbonato de sódio 2 M.

L-Arginina **1** → ($SOCl_2$, -10ºC, ROH) → Éster alquílico da L-arginina **2** → (Na_2CO_3 (2M)) → Éster alquílico da L-arginina **2'**

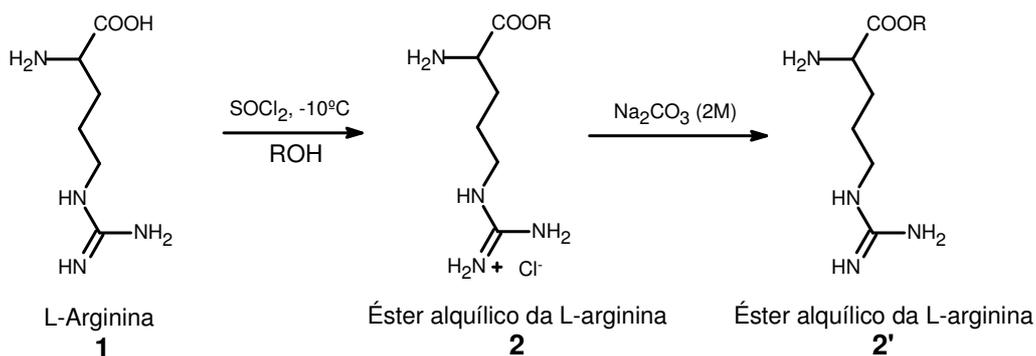



Figura 14 Síntese dos derivados ésteres alquílicos de L-arginina.

Na tabela 5 encontram-se os diferentes ésteres alquílicos da L-arginina com os respectivos rendimentos, observando-se que os ésteres que apresentam maiores rendimentos são o metílico e etílico.

Tabela 5 Ésteres alquílicos da L-arginina e respectivos rendimentos.

Ésteres alquílicos da L-arginina	R	η (%)
a	Me	84
b	Et	68
c	But	34
d*	Hex	61
e*	Oct	36

* obtidos na forma de base livre após adição de uma solução de carbonato de sódio 2 M

III. 1. 2. Imobilização dos ésteres de L-arginina em Sepharose

A imobilização dos ésteres alquílicos da L-arginina em Sepharose (figura 15) foi levada a cabo usando o método de fixação através do uso de um *bis*-epóxido [160]. Neste procedimento, uma suspensão de 2,5 g de Sepharose em 2,5 ml de solução de hidróxido de sódio 0,6M contendo 50 mg de borohidreto de sódio e 2,5 ml do éter de 1,4-butanedioldiglicidilo, foi aquecida durante 8h a 25ºC, sob agitação. A reacção de activação do epóxido da matriz foi parada por lavagem com uma grande quantidade de água. O suporte cromatográfico de afinidade final foi obtido por adição de 0,75 mg do éster de arginina **2** ou **2'**, 3,8 ml de solução de carbonato de sódio 2 M e 33 mg de borohidreto de sódio, que foi aquecido a 70ºC, sob agitação, durante 16 horas, seguido por lavagem abundante com água até as águas de lavagem apresentarem pH neutro.

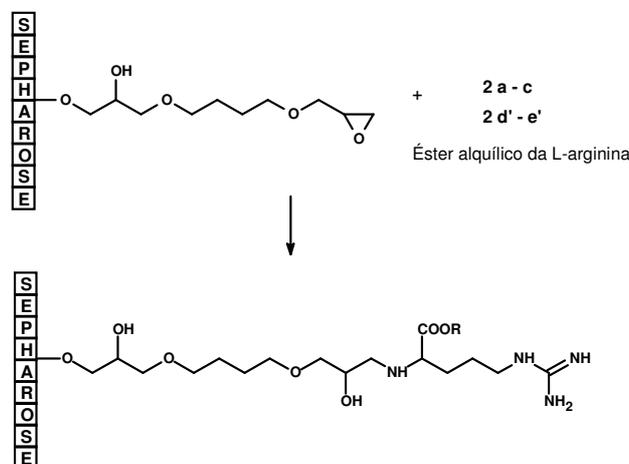



Figura 15 Imobilização dos ésteres da L-arginina em Sepharose.

É de esperar que a imobilização do aminoácido via bis-epóxido já ligado à Sepharose siga uma reacção S_N2 típicA (figura 16) de adições nucleofílicas a um epóxido em meio básico (solução de carbonato de sódio 2 M). Neste caso através da adição do grupo amino nucleofílico presente no aminoácido ao lado menos impedido do epóxido.

Arginina—$\ddot{N}H_2$

Nucleófilo

—C—C—

O:

H—Ö:

H

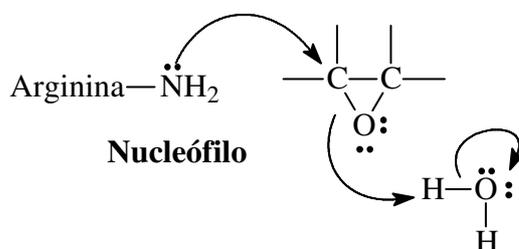



Figura 16 Reacção S_N2.

III. 1. 3. Matriz com o braço espaçador sem o aminoácido imobilizado

Como se pode visualizar através da figura 17, esta matriz é constituída por uma resina altamente reticulada, a Sepharose e por um braço espaçador que contém o grupo epóxido.

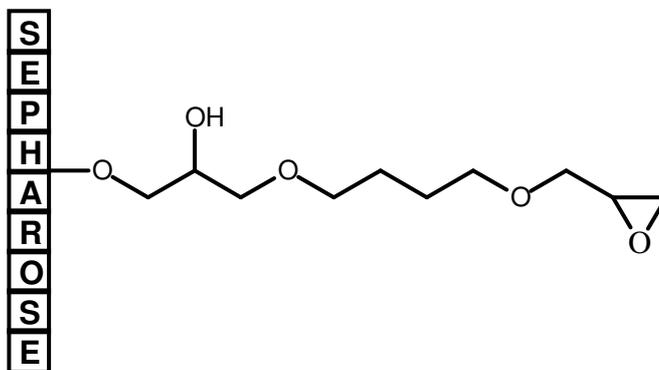



Figura 17 Representação esquemática da matriz com o braço espaçador sem o aminoácido.

Este ensaio foi realizado como branco de modo a estudar o tipo de interacção que pode ocorrer entre o pDNA e o braço espaçador, usando condições similares às utilizadas nos estudos das restantes matrizes. Equilibrou-se a coluna com Tris-HCl, adicionaram-se 100 µL da amostra e posteriormente aumentou-se a força iónica utilizando as concentrações de 200 mM e 500 mM de NaCl. A selecção destas condições está

associada ao comportamento de retenção do pDNA que já foi descrito para a matriz de arginina [161]. A ligação ocorre para baixa força iónica e a sua eluição é promovida por aumento da concentração de sal. Assim, o ensaio controlo sem o aminoácido foi realizado seguindo a mesma estratégia.

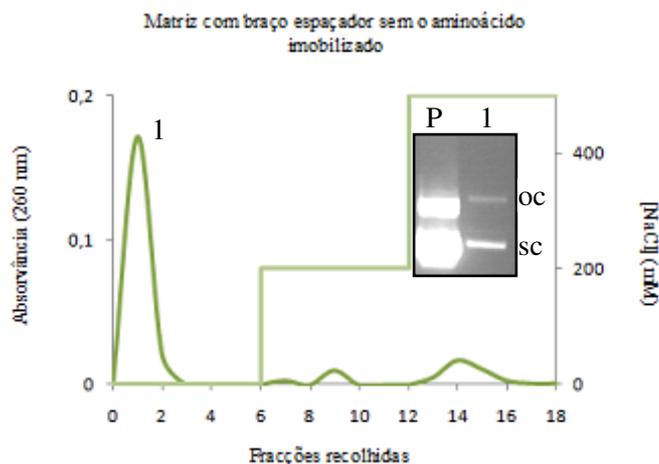



Figura 18 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de Sepharose e respectiva electroforese em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna. 1- Fracção recolhida usando coluna de Sepharose (Tris-HCl).

Como se pode visualizar através da figura 18, o pDNA elui imediatamente aquando da aplicação do Tris-HCl, indicando fracas interacções da molécula com esta matriz e particularmente com o braço espaçador. Este resultado indica que, segundo as condições usadas para as matrizes com aminoácidos imobilizados, não há interacção do pDNA com o braço espaçador e nestas matrizes com aminoácidos qualquer interacção que ocorra irá envolver o aminoácido ou o derivado.

III. 1. 4. Comparação das condições de retenção para cada matriz de arginina

O trabalho já descrito de purificação de pDNA com uma matriz de arginina apresenta a possibilidade de separar duas isoformas de pDNA usando um gradiente crescente de NaCl [154]. A introdução de novos grupos no aminoácido poderá facilitar a interacção do pDNA com as matrizes envolvendo os novos grupos químicos. Para estudar o efeito da modificação do aminoácido arginina por introdução de grupos alquílicos e a influência destes novos grupos na interacção com o pDNA, realizaram-se alguns ensaios cromatográficos. As amostras de pDNA foram aplicadas nas diferentes matrizes

de modo a compreender os respectivos padrões de retenção e eluição, assim como o efeito da força iónica nas interacções. Utilizou-se um gradiente crescente de concentração de NaCl, e na tabela 6 estão descritas as concentrações que favorecem a ligação e eluição total do pDNA.

Tabela 6 Quadro resumo sobre as condições de retenção e de eluição da arginina e derivados.

	Retenção [mM de NaCl]	**Eluição total [mM de NaCl]**
Arginina - Sepharose	≤ 150	200
Éster metílico da arginina-Sepharose	≤ 250	400
Éster etílico da arginina-Sepharose	≤ 200	250
Éster butílico da arginina-Sepharose	≤ 200	250
Éster hexílico da arginina - Sepharose	≤ 80	100
Éster octílico da arginina-Sepharose	---	0

De seguida, encontram-se alguns exemplos de cromatogramas obtidos para cada aminoácido e respectivos derivados. As fracções obtidas de cada um dos picos foram analisadas por electroforese em gel de agarose a 1%, de modo a identificar as espécies que estavam a eluir, e assim concluir acerca da interacção do pDNA com as diferentes matrizes.

Arginina – Sepharose

Comparando esta matriz com a que esta representada na figura 17, verifica-se que contêm a arginina como aminoácido imobilizado (figura 19). A escolha desta matriz teve como objectivo a comparação das condições de retenção e eluição do pDNA entre esta e as matrizes derivadas da arginina por introdução de novos grupos.

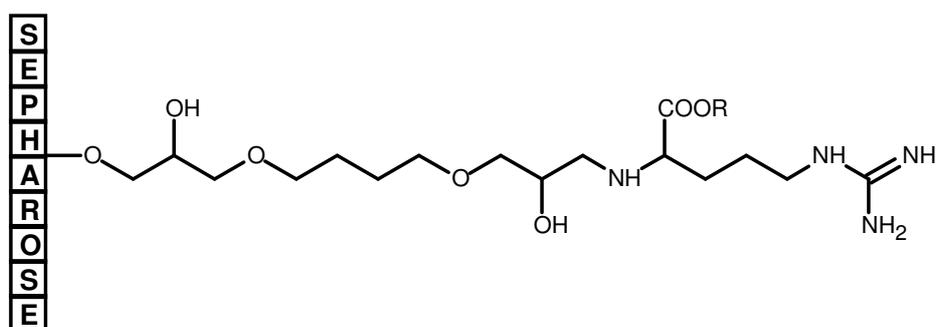



Figura 19 Representação esquemática da matriz de arginina – Sepharose.

Com a utilização desta matriz com arginina imobilizada, espera-se encontrar uma interacção com o pDNA. A estratégia de eluição usada foi seleccionada com base nos estudos publicados sobre a purificação de pDNA com matriz de arginina, uma vez que está descrito que o pDNA interage com a matriz aquando da adição de baixas concentrações de NaCl e há medida que a força iónica aumenta, o pDNA elui [154].

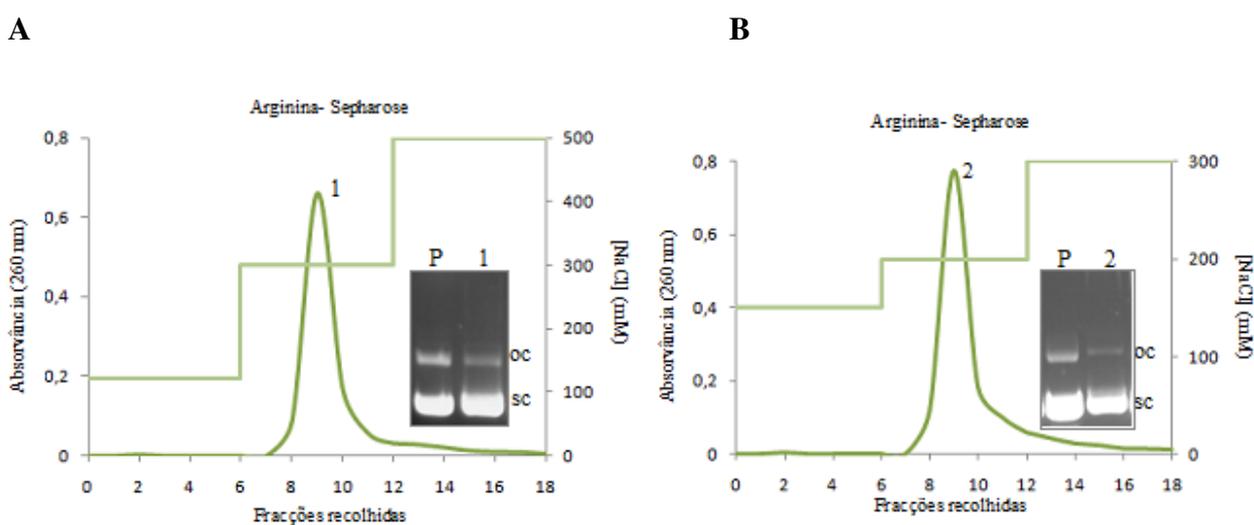



Figura 20 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de arginina – Sepharose com as respectivas electroforeses em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna. 1- Fracção recolhida usando 300 mM de NaCl do ensaio A. 2- Fracção recolhida usando 200 mM de NaCl do ensaio B.

Analisando a figura 20 A observa-se que a coluna foi equilibrada com 120 mM de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH =8,0). Após a aplicação do pDNA, verifica-se que o pDNA ficou retido a 120 mM de NaCl, eluindo totalmente a 300 mM de NaCl (pico 1). Como o plasmídeo ficou retido a 120 mM de NaCl testou-se a hipótese de aumentar a concentração de sal inicial para verificar o perfil de retenção. Deste modo, aumentou-se a concentração para 150 mM de NaCl (figura 20 B) e observou-se que nesta condição ocorre interacção do pDNA com a matriz, eluindo totalmente a 200 mM do mesmo sal (pico 2). As fracções foram agrupadas de acordo com os cromatogramas obtidos e analisados por electroforese em gel de agarose, onde se observou a eluição do plasmídeo de interesse (linha 1 e 2).

Foram ainda realizados vários ensaios aplicando a mesma estratégia de eluição por passos de modo a determinar as condições específicas de ligação do pDNA à coluna. Concluiu-se assim que, na matriz de arginina-Sepharose, o pDNA liga-se à matriz a 150 mM de NaCl, eluindo a 200 mM de NaCl. As interacções que ocorrem entre o DNA e a matriz promovem estabilidade, conduzindo a uma elevada eficácia do suporte da arginina de se ligar ao pDNA a baixa força iónica [154]. Estudos atómicos realizados numa estrutura complexa de DNA-proteína mostraram que a arginina promove interacções com a guanina via ligações de hidrogénio, forças van der Waals ou ligações de hidrogénio mediada pela água [149,161]. Como a arginina se trata de um aminoácido básico, contém um grupo carregado positivamente, o grupo guanidino, que facilmente se liga aos grupos fosfato do pDNA carregados negativamente, induzindo interacções electrostáticas.

Éster metílico da arginina – Sepharose

No decorrer deste estudo utilizaram-se matrizes com aminoácidos modificados com cadeia alquílica de tamanho crescente. Na figura 21 está representada a matriz do éster metílico da arginina – Sepharose, a qual foi obtida pela ligação da arginina metil esterificada, à Sepharose pelo *bis*-epóxido.

Éster metílico de L-arginina

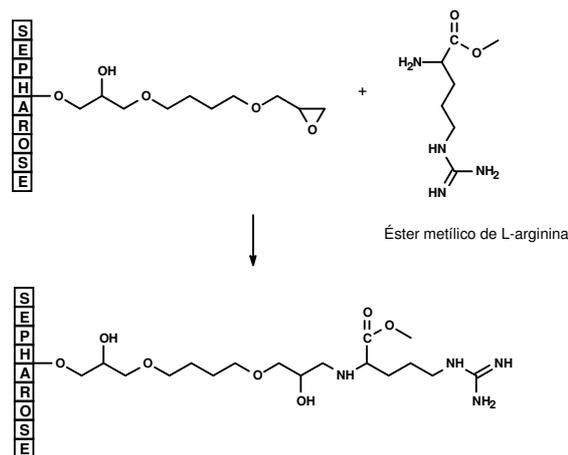



Figura 21 Representação esquemática da matriz de éster metílico da arginina – Sepharose.

Neste estudo começou-se por testar as mesmas condições referidas para o ensaio representado na figura 20 A, para comparar o perfil de retenção entre as matrizes. A estratégia de eluição usada foi semelhante à apresentada para a matriz anterior, ou seja, aumentando a concentração.

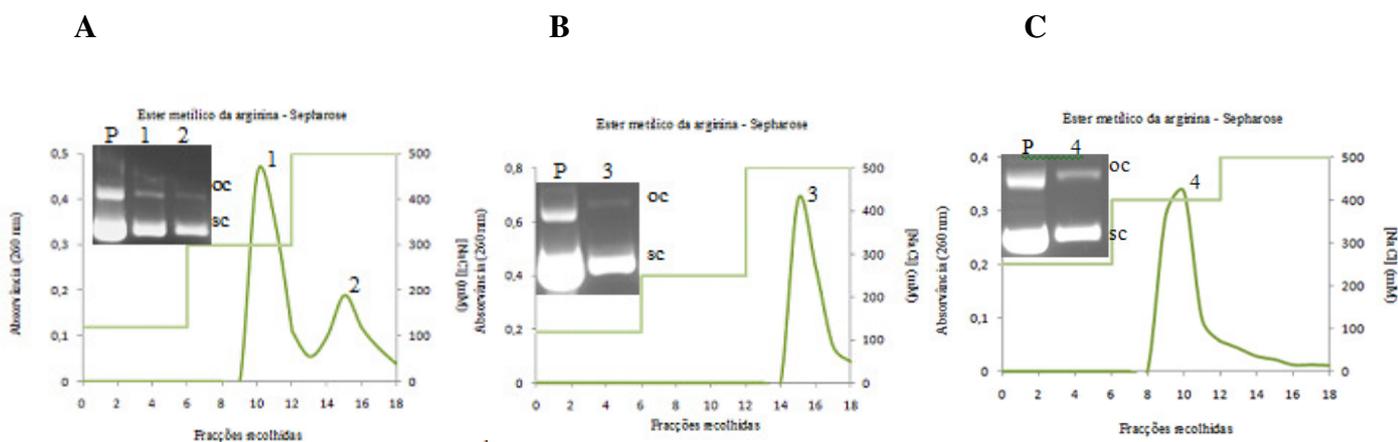



Figura 22 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) no suporte de éster metílico da arginina – Sepharose com as respectivas electroforeses em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna. 1- Fracção recolhida usando 300 mM de NaCl do ensaio A. 2- Fracção recolhida usando 500 mM de NaCl do ensaio A. 3- Fracção recolhida usando 500 mM de NaCl do ensaio B. 4- Fracção recolhida usando 400 mM de NaCl do ensaio C.

Na figura 22 estão representados alguns cromatogramas obtidos no estudo de caracterização da retenção e eluição do pDNA na matriz de éster metílico da arginina – Sepharose. O estudo foi iniciado usando as mesmas condições referidas na figura 20 A,

nomeadamente 120 mM, 300 mM e 500 mM de NaCl com o intuito de verificar se as matrizes se comportam de maneira semelhante ou se a introdução do grupo éster metílico influencia a retenção. Ao utilizar estas condições, verificou-se que apesar de em ambas as matrizes o pDNA eluir a 300 mM de NaCl, observa-se uma maior retenção do pDNA com a matriz de éster metílico da arginina-Sepharose (figura 22 A) do que somente com a arginina – Sepharose (figura 20 A). Como se pode constatar pela figura 22 A, o pDNA ficou retido a 120 mM de NaCl, eluindo uma fracção a 300 mM de NaCl (linha 1) e uma segunda fracção a 500 mM de NaCl (linha 2). Com a realização deste ensaio verifica-se ainda que a fracção mais retida que elui a 500 mM de NaCl se apresenta quase totalmente na conformação superenrolada, o que sugere uma interacção preferencial da matriz com esta isoforma.

A concentração de sal inicial foi aumentada para 250 mM de NaCl (figura 22 B) e verificou-se que o plasmídeo também ficou retido nestas condições, eluindo a 500 mM de NaCl (linha 3) e na figura 22 C está representada a concentração mínima que promove a eluição total do pDNA (linha 4). Pode-se então concluir que, usando esta matriz, o pDNA fica retido a 250 mM de NaCl e elui a 400 mM de NaCl. Comparando esta matriz com a matriz não modificada (arginina – Sepharose) verifica-se que aumentando a cadeia alquílica, há uma maior retenção do pDNA. Na matriz não modificada, o pDNA liga-se a 150 mM de NaCl, eluindo a 200 mM de NaCl e, na modificada o pDNA fica retido até 250 mM de NaCl, eluindo a 400 mM de NaCl. Como as moléculas do plasmídeo são polianiónicas, a força iónica do ambiente que o rodeia tem um efeito profundo na sua estrutura. Devido ao facto do pDNA se ligar a baixas forças iónicas indica a presença de fortes interacções da matriz com os grupos fosfato do pDNA.

Éster etílico da arginina – Sepharose

A matriz representada na figura 23 foi obtida pela ligação da arginina etil esterificada, à Sepharose pelo *bis*-epóxido.

Éster etílico de L-arginina

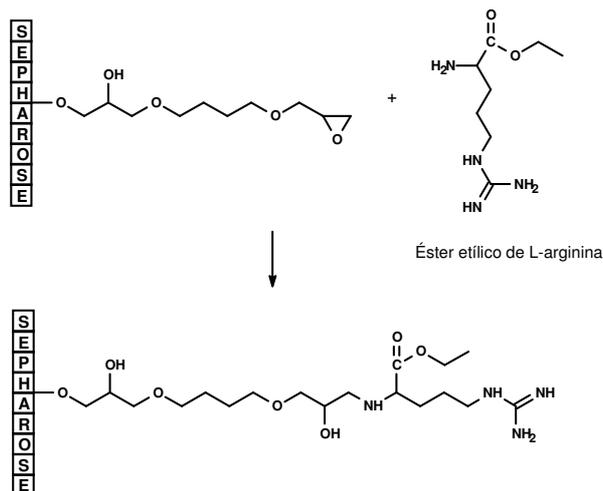



Figura 23 Representação esquemática da matriz de éster etílico da arginina – Sepharose.

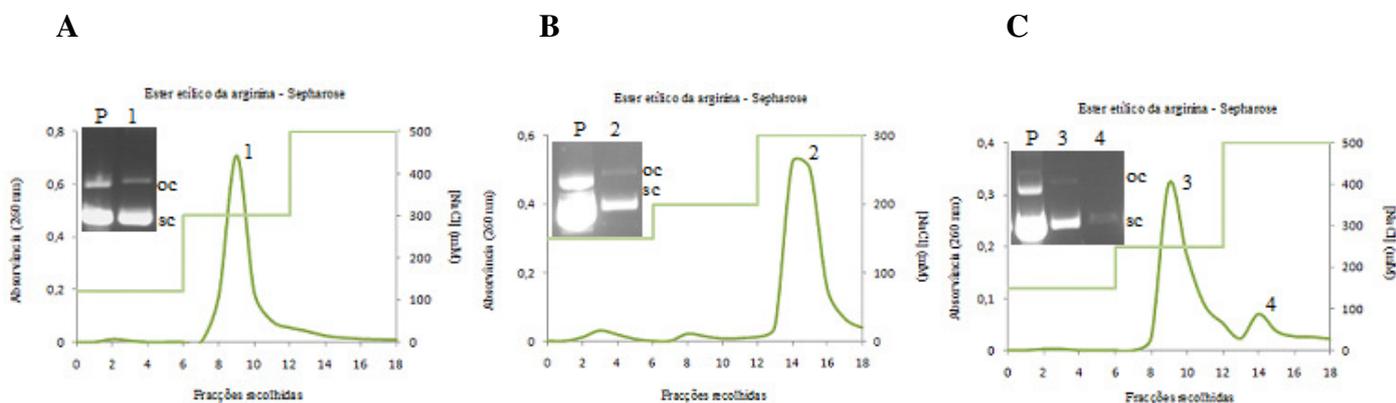



Figura 24 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de éster etílico da arginina – Sepharose com as respectivas electroforeses em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna. 1- Fracção recolhida usando 300 mM de NaCl do ensaio A. 2- Fracção recolhida usando 300 mM de NaCl do ensaio B. 3- Fracção recolhida usando 250 mM de NaCl do ensaio C. 4- Fracção recolhida usando 500 mM de NaCl do ensaio C.

Analisando os perfis cromatográficos da figura 24 verifica-se também que, o pDNA liga-se à matriz utilizando baixas concentrações de sal e, à medida que a força iónica do tampão aumenta o plasmídeo elui. Relativamente à figura 24 A testaram-se as seguintes condições: 120 mM de NaCl, 300 mM de NaCl e 500 mM de NaCl. O pDNA ficou retido a baixas concentrações de sal eluindo totalmente 300 mM de NaCl (linha 1). Na figura 24 B observa-se que o pDNA é retido a 150 mM de NaCl e a 200 mM de NaCl, eluindo a 300 mM de NaCl (linha 2). O resultado apresentado na figura 24 C mostra que o plasmídeo é retido a 150 mM, eluindo maioritariamente a 250 mM de NaCl (linha 3) e a 500 mM de NaCl (linha 4). Este último perfil cromatográfico serviu para identificar a

concentração mínima que favorece a eluição da molécula alvo. Assim se conclui que concentrações de NaCl inferiores a 200 mM de NaCl favorecem a retenção do pDNA, mas a sua eluição é imediatamente promovida a 250 mM de NaCl. Comparando estes resultados com a matriz de éster metílico da arginina – Sepharose, observa-se que esta matriz induz interacções mais fracas com a molécula alvo, uma vez que a gama de concentração de retenção/eluição do pDNA é restrita. Poderia esperar-se que o aumento da cadeia alquílica nas matrizes favorecesse a retenção do pDNA, mas tal facto não sucedeu para a matriz éster etílico de arginina-Sepharose.

Éster butílico da arginina – Sepharose

Esta matriz foi obtida pela ligação da arginina butil esterificada, à Sepharose pelo *bis*-epóxido (figura 25).

Éster butílico de L-arginina

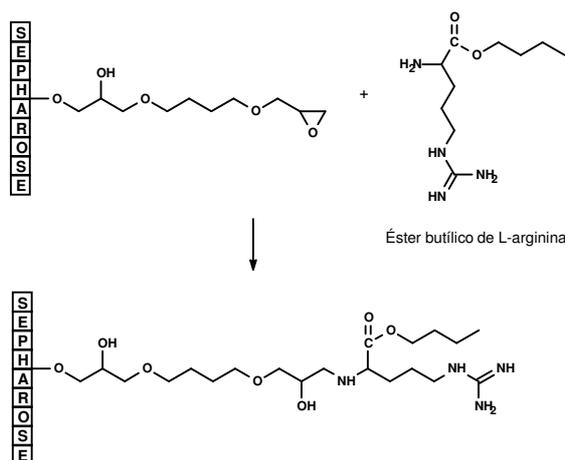



Figura 25 Representação esquemática da matriz de éster butílico da arginina – Sepharose.

Ao utilizar a matriz que está representada na figura 25, aplicaram-se as mesmas condições que foram utilizadas para a matriz de éster etílico da arginina – Sepharose, de modo a averiguar se esta matriz tem um comportamento semelhante à matriz referida anteriormente.

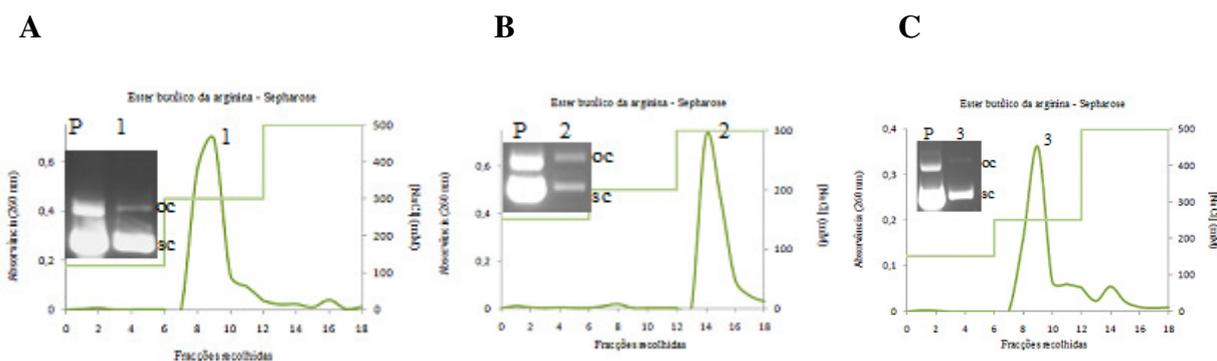



Figura 26 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de éster butílico da arginina – Sepharose com as respectivas electroforeses em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna. 1- Fracção recolhida usando 300 mM de NaCl do ensaio A. 2- Fracção recolhida usando 300 mM de NaCl do ensaio B. 3- Fracção recolhida usando 250 mM de NaCl do ensaio C.

Neste estudo, e ao utilizar a mesma estratégia de eluição já referida, verificou-se que o pDNA teve um comportamento semelhante ao observado para a matriz de éster etílico de arginina – Sepharose (figura 26). O pDNA interagiu com a coluna a 120 mM de NaCl, eluindo totalmente a 300 mM de NaCl (figura 26 A, linha1). Ao aumentar a concentração de sal inicial para 150 mM observou-se que o plasmídeo também ficou retido (figura 26 B). Após realização de várias experiências concluiu-se que o pDNA retém e elui nas mesmas condições que a matriz éster etílico de arginina – Sepharose, isto é, fica retido a 200 mM de NaCl e elui a 250 mM do mesmo sal. Com a análise destes resultados surge a hipótese de que, ao aumentar a cadeia alquílica há uma diminuição das interacções do pDNA com a matriz, o que sugere que eventualmente o aumento da cadeia alquílica pode representar um impedimento do acesso do pDNA à região do ligando responsável pela retenção. Para confirmar esta possibilidade realizaram-se alguns estudos com derivados de arginina de maior cadeia alquílica.

Éster hexílico da arginina – Sepharose

A escolha desta matriz (figura 27) teve como objectivo a avaliação da capacidade de retenção do pDNA num suporte com ligandos de cadeia mais longa. Esta matriz foi obtida pela ligação da arginina hexil esterificada, à Sepharose pelo *bis*-epóxido.

Éster hexílico de L-arginina

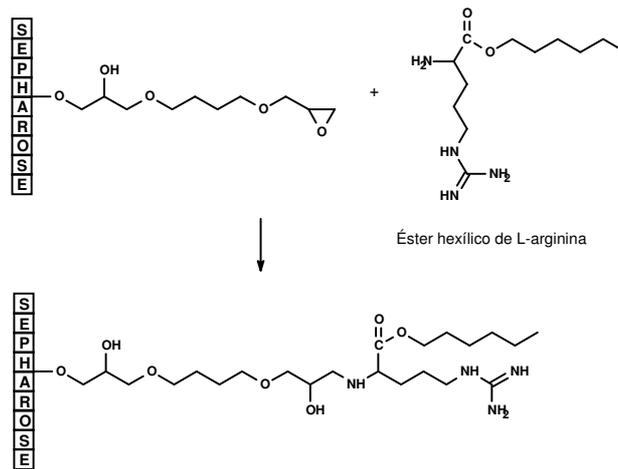



Figura 27 Representação esquemática da matriz de éster hexílico da arginina – Sepharose.

A síntese de derivados de arginina de maior comprimento e a sua imobilização permite verificar se a retenção do pDNA é ou não influenciada pelo tamanho da cadeia.

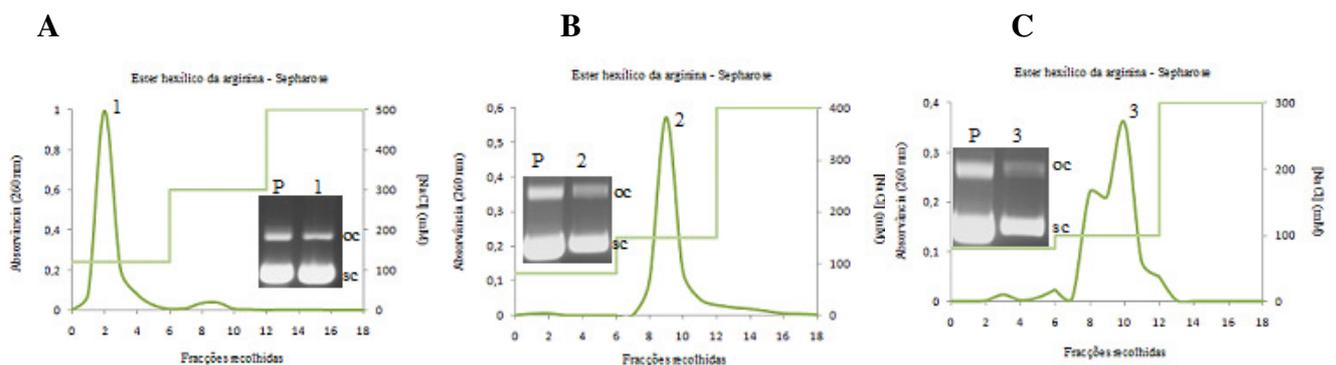



Figura 28 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de éster hexílico da arginina – Sepharose com as respectivas electroforeses em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna; 1- Fracção recolhida usando 120 mM de NaCl do ensaio A. 2- Fracção recolhida usando 150 mM de NaCl do ensaio B. 3- Fracção recolhida usando 100 mM de NaCl do ensaio C.

Apesar do pDNA ser uma molécula polianiónica e do carácter positivo da arginina poder antecipar a presença de interacções electrostáticas, estas não ocorrem com intensidade suficiente para promover a ligação do pDNA à coluna. Ao aplicar 120 mM de NaCl, constata-se que o pDNA elui totalmente (figura 28 A, linha 1). Nesta concentração, o pDNA permanece retido nas matrizes referidas anteriormente (arginina – Sepharose e ésteres metílico, etílico e butílico da arginina – Sepharose). Deste modo, foi ainda testada uma concentração inferior de 80 mM de NaCl, e verificou-se que já houve interacção do pDNA com a coluna (figura 28 B), eluindo a 150 mM de NaCl

(linha 2). Efectuaram-se vários ensaios e verificou-se que nesta matriz, o pDNA fica retido a 80 mM de NaCl eluindo a 100 mM de NaCl (figura 28 C, linha 3), revelando o enfraquecimento da interacção na presença de ligandos mais complexos.

Éster octílico da arginina – Sepharose

A matriz de éster octílico da arginina – Sepharose que está representada na figura 29 é a matriz que apresenta o ligando de maior comprimento da cadeia. Foi obtida pela ligação da arginina octil esterificada, à Sepharose pelo *bis*-epóxido.

Éster octílico de L-arginina

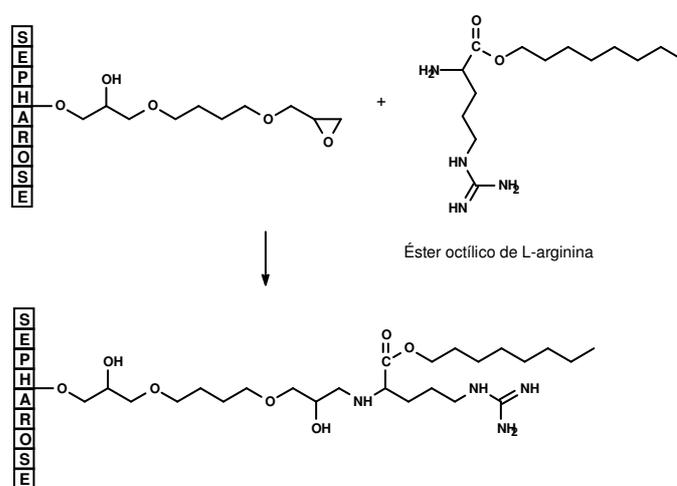



Figura 29 Representação esquemática da matriz de éster octílico da arginina – Sepharose.

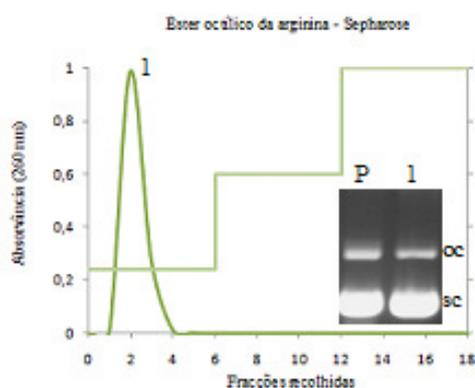
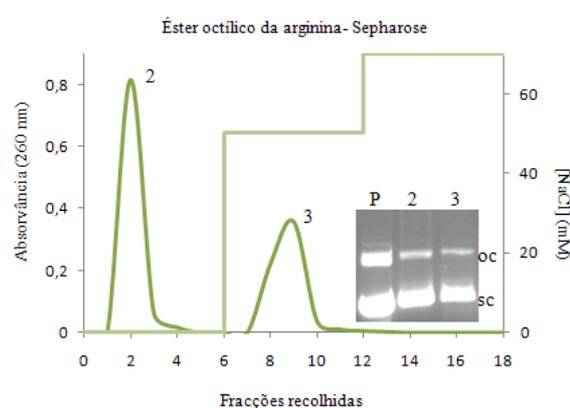



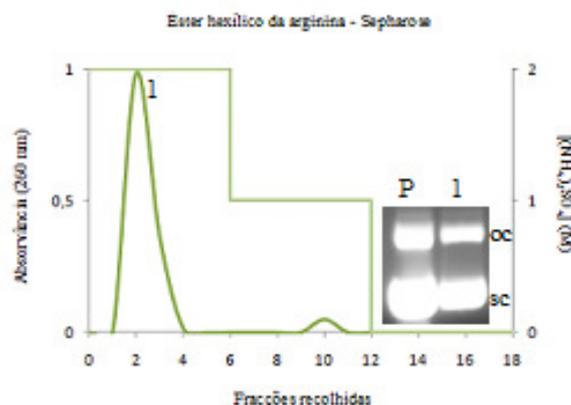
Figura 30 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de éster octílico da arginina – Sepharose com as respectivas electroforeses em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna; 1- Fracção recolhida usando 120 mM de NaCl do ensaio A. 2- Fracção recolhida usando Tris-HCl do ensaio B. 3- Fracção recolhida usando 50 mM de NaCl do ensaio B.

Pelos cromatogramas obtidos e pelas respectivas análises das fracções em electroforese em gel de agarose (figura 30), verificou-se que o pDNA não se ligou à coluna quando submetido a baixas concentrações de NaCl (figura 30 A). Mesmo utilizando o tampão Tris-HCl a molécula alvo eluiu quase totalmente (figura 30 B, linha 2). Analisando os cromatogramas obtidos nos ensaios com as cadeias alquílicas de menor comprimento verifica-se que o pDNA fica retido ao utilizar baixas concentrações de NaCl, e, há medida que a força iónica aumenta o pDNA elui. Mas, tal facto não se verifica nas matrizes éster hexílico da arginina – Sepharose e éster octílico da arginina – Sepharose. O pDNA não interage com estas cadeias alquílicas de maior comprimento, eluindo mesmo com a aplicação do tampão Tris-HCl. A razão para este comportamento é que poderá haver um impedimento estereoquímico à medida que a cadeia alquílica aumenta. A complexidade do ligando pode comprometer o acesso do plasmídeo aos sítios de ligação, minimizando a interacção.

III. 1. 5. Comparação das condições de retenção nas matrizes de éster hexílico da arginina – Sepharose e éster octílico da arginina – Sepharose usando um gradiente de $(NH_4)_2SO_4$

Como foi descrito, nas matrizes de éster hexílico da arginina – Sepharose e de éster octílico da arginina – Sepharose, o pDNA elui com a aplicação de tampões com baixa força iónica, não favorecendo as interacções electrostáticas. Deste modo, para explorar a possibilidade de ocorrência de outro tipo de interacção, como interacções hidrofóbicas, entre o pDNA e os aminoácidos e particularmente a cadeia alquílica de maior tamanho, efectuou-se outro estudo utilizando o $(NH_4)_2SO_4$.

Éster hexílico da arginina – Sepharose

Nestes ensaios, utilizou-se um gradiente de três passos que estão representados na figura seguinte, e neste caso a eluição é promovida por diminuição da força iónica.

A **B**

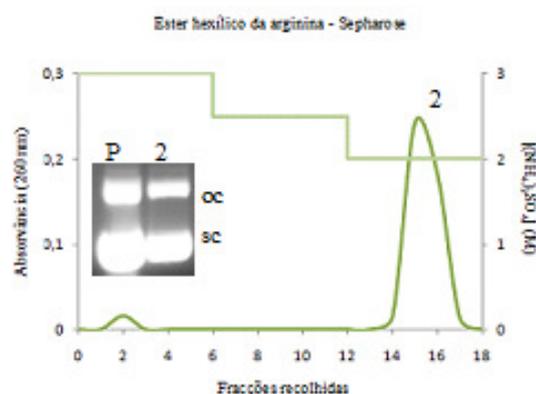



Figura 31 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de éster hexílico da arginina – Sepharose com as respectivas electroforeses em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna; 1- Fracção recolhida usando 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio A. 2- Fracção recolhida usando 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio B.

No primeiro ensaio, (figura 31 A) verificou-se que o perfil cromatográfico apresenta um pico aquando da eluição com 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ o que sugere uma fraca interacção do pDNA com a matriz nestas condições. No segundo ensaio, aumentou-se a concentração de sal inicial para 3,0 M e observou-se que este aumento de concentração favorece a ligação do pDNA à matriz de éster hexílico da arginina – Sepharose, sendo possível a sua retenção na coluna. Quando se diminuiu a concentração de sal para 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$, o pDNA eluiu indiferencialmente (figura 31 B, linha 2) sem que ocorra selectividade em relação a qualquer das isoformas. Pode-se então concluir que o pDNA interage com esta matriz a 3,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ eluindo a 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$. Segundo já descrito, a matriz de arginina promove múltiplas interacções com o pDNA, incluindo não só interacções electrostáticas, como também interacções hidrofóbicas. Estas interacções são possíveis uma vez que envolvem a parte alifática da cadeia lateral da arginina e o braço espaçador e neste caso em particular, a cadeia alquílica associada à arginina, desempenhando um papel importante na ligação do pDNA às matrizes [131].

Éster octílico da arginina - Sepharose

Aplicando a mesma estratégia que a descrita anteriormente para a matriz de éster hexílico da arginina – Sepharose (figura 32 A) obtiveram-se os seguintes cromatogramas dos ensaios realizados na matriz éster octílico de arginina – Sepharose, com um gradiente decrescente de concentração de sulfato de amónio.

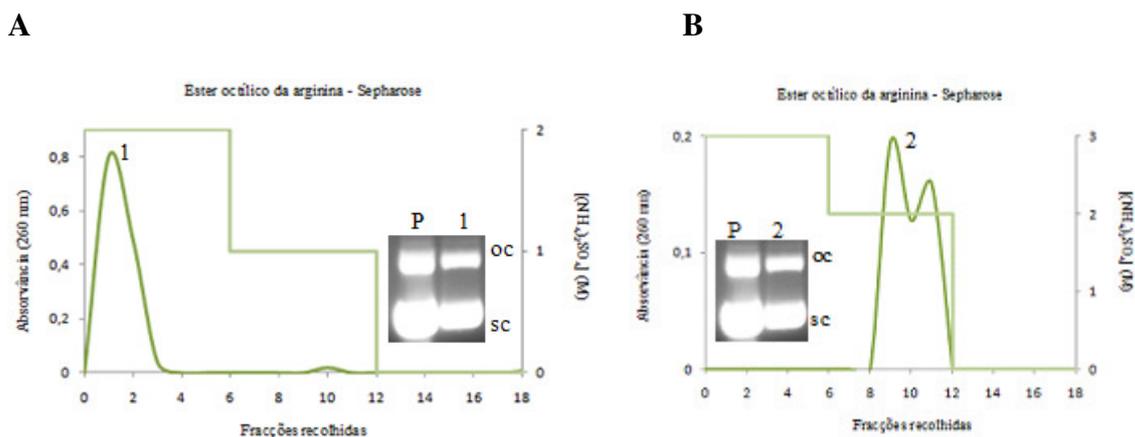



Figura 32 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de éster octílico da arginina – Sepharose com as respectivas electroforeses em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna. 1- Fracção recolhida usando 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio A. 2- Fracção recolhida usando 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio B.

Pelo cromatograma obtido e pela electroforese correspondente (figura 32 A, linha 1), verificou-se que o pDNA não se ligou à coluna quando submetido às condições descritas (2,0 M; 1,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ e Tris-HCl). No entanto, ao aumentar também a concentração inicial para 3,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ (figura B), o pDNA ficou retido, eluindo a 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ (linha 2). Pode-se concluir que estas matrizes de maior comprimento têm um comportamento semelhante relativamente à retenção e eluição, aquando da utilização de um gradiente decrescente de $(NH_4)_2SO_4$ (M). O resultado global encontra-se descrito na tabela 7.

Tabela 7 Quadro resumo sobre os tempos de retenção utilizando o $(NH_4)_2SO_4$

	Retenção $[(NH_4)_2SO_4]$(M)	**Eluição $[(NH_4)_2SO_4]$(M)**
Éster hexílico da arginina - Sepharose	3,0	2,0
Éster octílico da arginina - Sepharose	3,0	2,0

Pode-se então concluir que a matriz de arginina promove múltiplas interacções com o pDNA, incluindo não só interacções electrostáticas e hidrofóbicas, mas também o bioreconhecimento das bases dos nucleótidos através do ligando arginina [131]. As características da arginina, nomeadamente a capacidade de interagir em diferentes conformações, o comprimento da cadeia lateral e a capacidade para produzir boas geometrias de ligações de hidrogénio são responsáveis pelas múltiplas interacções que podem ocorrer entre o ligando arginina e as moléculas de pDNA [163]. Neste caso em particular, verificámos ainda que uma cadeia alquílica de maior tamanho, causa uma diminuição da retenção, para baixas concentrações de sal, possivelmente devido a um impedimento estereoquímico, mas explorando a interacção hidrofóbica que envolve esta cadeia é possível promover a interacção com o pDNA.

III. 1. 6. Separação das diferentes isoformas do DNA plasmídico

O estabelecimento de processos biotecnológicos confiáveis e económicos para purificar plasmídeos requer a profunda compreensão e a melhoria das diversas operações unitárias envolvidas. O desenvolvimento de cada técnica visa tirar partido de todos os métodos envolvidos, a fim de explorar todas as potencialidades nos avanços realizados para melhorar o futuro do processo global, contribuindo para os melhores resultados da aplicação terapêutica do pDNA .

Ao explorar as interacções que ocorrem entre os aminoácidos e as moléculas de ácidos nucleicos, pretende-se não só isolar o pDNA das impurezas presentes no extracto da *E. coli*, como também purificar de uma forma eficiente a isoforma do plasmídeo biologicamente activa, a isoforma sc do pDNA. Considerando as particularidades do pDNA, e os desafios implícitos na sua purificação, é necessário ajustar todas as condições cromatográficas para melhorar o desempenho da estratégia de purificação, garantindo a estabilidade da isoforma sc do pDNA durante o processo.

As condições de retenção/eluição bem definidas são fundamentais para melhorar o desempenho da purificação, e para alcançar uma maior eficiência e selectividade na cromatografia de afinidade com base na arginina imobilizada, podendo representar um impacto significativo em aplicações terapêuticas da isoforma sc assim purificada. Deste modo, após estabelecidas as condições de retenção para cada matriz utilizada, procedeu-se à tentativa de separação das diferentes isoformas do pDNA, nas matrizes que

permitem alguma manipulação da concentração de sal na gama estabelecida para a retenção e eluição do pDNA.

Arginina – Sepharose

A capacidade da arginina, como ligando imobilizado na cromatografia de afinidade, foi recentemente demonstrada na separação das isoformas oc e sc do pDNA, revelando a presença de uma interacção específica com o plasmídeo e um reconhecimento especial da isoforma sc [154]. Após a ligação do pDNA à matriz de arginina, a eluição realizou-se usando um aumento do gradiente de NaCl ou por adição de um tampão suplementado com a arginina [162].

Após se terem realizado os ensaios preliminares descritos anteriormente para verificar quais as condições que favoreciam a ligação e eluição do pDNA e, sabendo que na matriz de arginina – Sepharose, o pDNA ficou retido a 150 mM de NaCl eluindo a 200 mM do mesmo sal, realizaram-se ensaios nessa gama com o intuito de tentar separar as isoformas do pDNA, explorando a possibilidade de uma interacção selectiva com alguma destas formas.

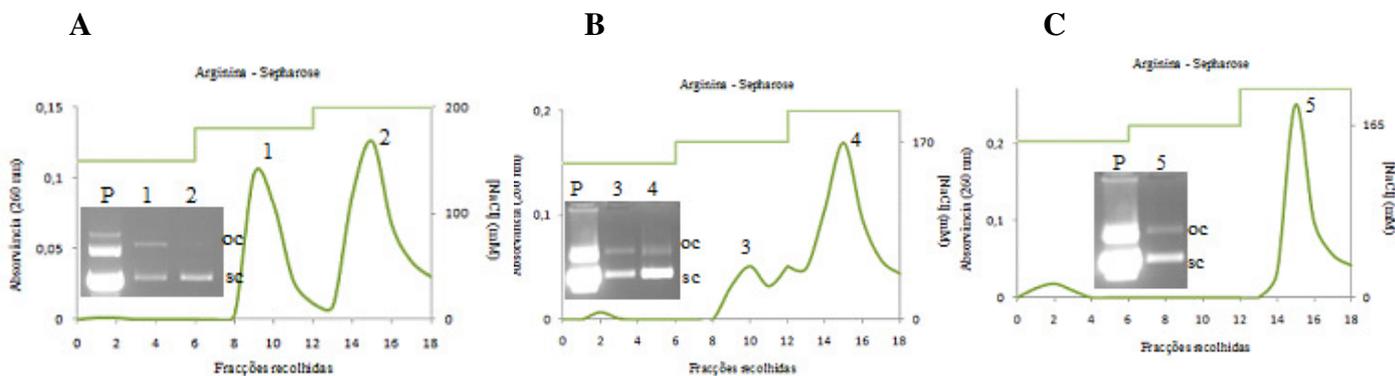



Figura 33 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de arginina – Sepharose com as respectivas electroforeses em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna; 1- Fracção recolhida usando 180 mM de NaCl do ensaio A. 2- Fracção recolhida usando 200 mM de NaCl do ensaio A. 3- Fracção recolhida usando 170 mM de NaCl do ensaio B. 4- Fracção recolhida usando 200 mM de NaCl do ensaio B. 5- Fracção recolhida usando 200 mM de NaCl do ensaio C.

No primeiro ensaio cromatográfico (figura 33 A), as espécies eluídas no primeiro pico, correspondente à eluição com 180 mM de NaCl, são visíveis na electroforese (linha 1) duas bandas correspondentes às duas isoformas do pDNA (oc + sc). No entanto, no segundo pico obtido com a concentração de 200 mM de NaCl só está presente a

isoforma sc (linha 2). Como demonstrado na linha 1, perde-se uma fracção da isoforma sc no primeiro passo de eluição e para tentar melhorar este resultado e a ligação do sc à matriz realizou-se um segundo ensaio diminuindo a concentração para 170 mM com o intuito da isoforma oc eluir e a 200 mM de NaCl eluir a sc. No entanto, como se pode visualizar pela figura 33 B, apesar de maior quantidade de sc ficar retido, em ambos os picos (3 e 4) eluiram indiferenciadamente as duas isoformas do pDNA. Foi ainda testada uma menor concentração de NaCl (165 mM de NaCl), mas não se verificou uma separação diferenciada das isoformas (figura 33 C, linha 5), tendo o pDNA permanecido retido na coluna nestas condições.

Éster metílico da arginina – Sepharose

Com base nos resultados obtidos sobre as condições de ligação/eluição do pDNA na matriz de éster metílico de arginina-Sepharose, estabeleceu-se uma gama de concentrações para testar a eluição diferenciada das duas isoformas do pDNA, sabendo que, na matriz de éster metílico da arginina-Sepharose, o pDNA ficou retido a 250 mM de NaCl e eluiu a 400 mM do mesmo sal.

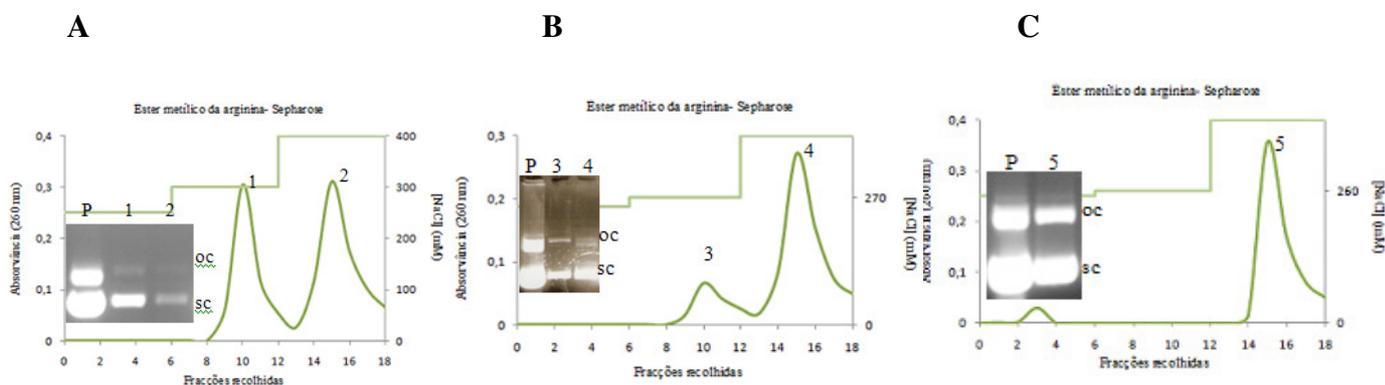



Figura 34 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de éster metílico da arginina – Sepharose com as respectivas electroforeses em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna; 1- Fracção recolhida usando 300 mM de NaCl do ensaio A. 2- Fracção recolhida usando 400 mM de NaCl do ensaio A. 3- Fracção recolhida usando 270 mM de NaCl do ensaio B. 4- Fracção recolhida usando 400 mM de NaCl do ensaio B. 5- Fracção recolhida usando 400 mM de NaCl do ensaio C.

Como se pode visualizar através dos perfis cromatográficos anteriores (figura 34), efectuaram-se ensaios utilizando um gradiente crescente com três passos, utilizando diferentes concentrações de sal. No entanto, não se verificou nenhuma eluição selectiva

das isoformas do pDNA nestes ensaios. Verificou-se que, o pDNA ligou-se à coluna quando submetidos a baixas concentrações de NaCl (250 mM de NaCl), e, há medida que se aumentou o gradiente de concentração as espécies eluiram. No entanto, como se pode visualizar pelas electroforeses em gel de agarose, as espécies eluídas no primeiro e segundo pico, correspondentes à eluição com 300 mM e 400 mM de NaCl são relativas às isoformas oc e sc do pDNA (linha 1 e 2). Como, ao utilizar 300 mM de NaCl eluíram as duas isoformas, baixou-se a concentração de sal para 270 mM (figura 34 B) e observou-se a eluição de alguma biomolécula (pico 3) que por electroforese se verificou ser correspondente à eluição conjunta das duas isoformas (linha 3). O pico 4 apresenta uma intensidade superior ao anterior, indicando a eluição total do pDNA (linha 4). Como mostra o perfil cromatográfico da figura 34 C, aquando da diminuição da concentração para 260 mM de NaCl observou-se retenção do pDNA com a coluna, obtendo-se posteriormente um pico (4), indicando a eluição total do pDNA a 400 mM de NaCl (linha 5).

Realizaram-se ainda alguns ensaios utilizando as matrizes de éster etílico da arginina – Sepharose e éster butílico da arginina – Sepharose sob as seguintes condições: 200 mM de NaCl → 230 mM de NaCl → 250 mM de NaCl, mas não foi igualmente possível alcançar a separação das diferentes isoformas do pDNA.

Éster hexílico da arginina – Sepharose

Efectuaram-se uma série de experiências cromatográficas, de modo a averiguar o comportamento das isoformas do pDNA nesta matriz. Os ensaios iniciaram-se com a adição de 3,0 M de $(NH_4)_2SO_4$, usando gradientes por passos (três passos), nos quais o perfil terminava com a aplicação da concentração de 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$. De seguida estão representados os cromatogramas, onde cada um dos picos cromatográficos foi posteriormente analisado por elecroforese, de modo a identificar que tipo de espécies estava a eluir (figura 35).

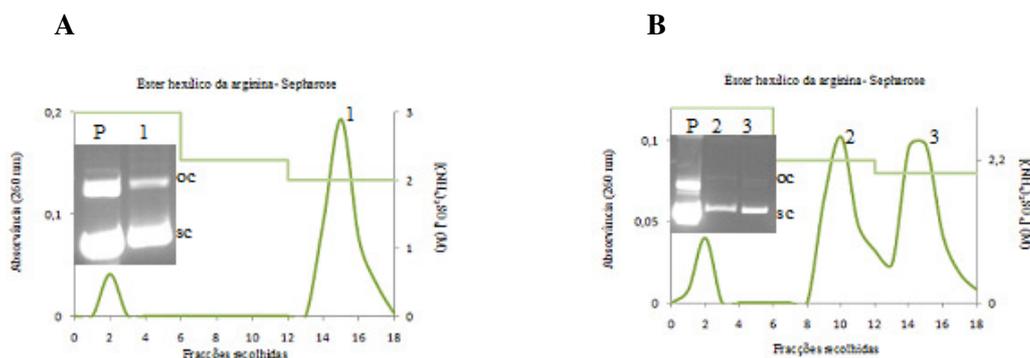



Figura 35 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de éster hexílico da arginina – Sepharose com as respectivas electroforeses em gel de agarose a 1%.P- Amostra de pDNA injectado na coluna; 1- Fracção recolhida usando 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio A. 2- Fracção recolhida usando 2,2 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio B. 3- Fracção recolhida usando 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio B.

Analisando os cromatogramas correspondentes à matriz de éster hexílico da arginina – Sepharose (figura 35) verifica-se que, como já tinha sido referido anteriormente, as elevadas concentrações de sulfato de amónio favorecem a retenção do plasmídeo. Ao tentar separar as isoformas do pDNA utilizando as concentrações descritas na figura A (3,0 M, 2,3 M e 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$) verificou-se que continuou retido a 2,3 M de $(NH_4)_2SO_4$, eluíndo totalmente aquando da adição de 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$, correspondente ao primeiro pico (linha 1). Ao diminuir a concentração de sal usada neste passo intermédio para 2,2 M $(NH_4)_2SO_4$, (figura B) observa-se a eluição das espécies em dois picos (linha 2 e 3). É de referir que ambas as isoformas eluem nestas condições, apesar de na electroforese, não serem muito visíveis as bandas correspondentes à isoforma oc (linha 2 e 3).

Utilizaram-se as mesmas condições para a matriz de éster octílico da arginina – Sepharose e observou-se que os resultados são semelhantes aos do éster hexílico da arginina – Sepharose.

Como se pode visualizar através das figuras 33-35, não se conseguiu separar diferencialmente as duas isoformas do pDNA. O facto de estes estudos serem realizados em colunas "de bancada", sem o controlo da temperatura também pode influenciar o resultado, na medida em que a separação das isoformas requer um controlo rigoroso de todos os parâmetros. Segundo Fani e seus colaboradores (2008), este parâmetro afecta as interacções do pDNA com a arginina, influenciando deste modo a retenção do pDNA e respectivas isoformas (a retenção destas aumenta com o aumento da temperatura)

[154]. Para melhorar os resultados e atingir uma separação diferenciada da isoforma sc e oc poderiam iniciar-se os estudos num sistema como por exemplo, o FLPC, uma vez que, permite o controlo de certos parâmetros que ao longo da realização deste trabalho não foram explorados.

Apesar de não se ter conseguido separar as diferentes isoformas do pDNA, sabe-se que a matriz de arginina já foi aplicada de forma eficiente para separar as isoformas do pDNA, revelando a presença de um reconhecimento particular da isoforma sc. As características da arginina, nomeadamente a capacidade de interagir em diferentes conformações, o comprimento da cadeia lateral e a capacidade para produzir boas geometrias de ligações de hidrogénio são responsáveis pela múltiplas interacções que podem ocorrer entre o ligando e as moléculas de pDNA (Fani et al., 2009). O mecanismo subjacente envolve não só interacções electrostáticas e hidrofóbicas entre o suporte e o pDNA como também o bioreconhecimento das bases dos ácidos nucleicos através do ligando da arginina [154].

A implementação de novas estratégias terapêuticas é parcialmente dependente da evolução da tecnologia do pDNA. Devido à singularidade do plasmídeo, a sua eficiente purificação ainda é um desafio, contudo, as estratégias de purificação utilizando a arginina como ligandos foram produzindo resultados interessantes no que diz respeito à purificação de plasmídeos.

III. 2. Histidina e derivados

III. 2. 1. Imobilização do éster metílico de L-histidina em Sepharose

Relativamente à imobilização do éster metílico da L-histidina em Sepharose (figura 36), procedeu-se de igual modo como para o caso da arginina.

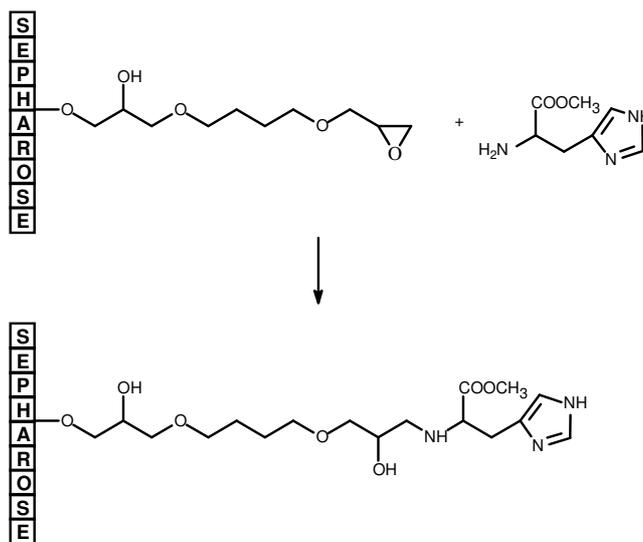



Figura 36 Imobilização do éster metílico da L-histidina em Sepharose.

III. 2. 2. Matriz com o braço espaçador sem o aminoácido imobilizado

Na da figura 37 pode-se observar a primeira matriz que foi utilizada ao realizar este trabalho experimental. Esta matriz é constituída por um braço espaçador que contém o grupo epóxido, este braço está acoplado à Sepharose.

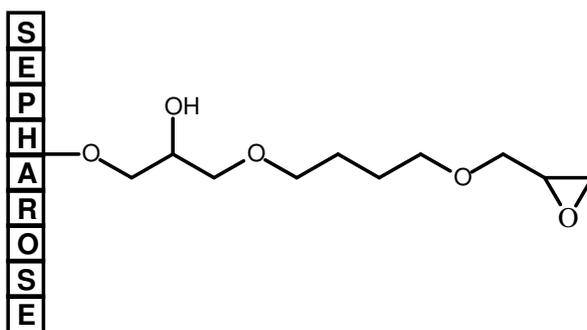



Figura 37 Representação esquemática da matriz com o braço espaçador sem o aminoácido.

Este ensaio foi realizado como um branco, cujo objectivo foi estudar o tipo de interacção que pode ocorrer entre o pDNA e o braço espaçador, usando condições similares às utilizadas nos estudos das restantes matrizes. A selecção destas condições, 2,5 M, 2,3 M, 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ e Tris-HCl está associada ao comportamento de retenção do pDNA que já foi descrito para a matriz de histidina. Utilizando elevadas concentrações de sal, o pDNA interage com a matriz, eluindo aquando da diminuição da concentração de sal [155]. Assim, o ensaio controlo sem o aminoácido foi realizado seguindo a mesma estratégia.

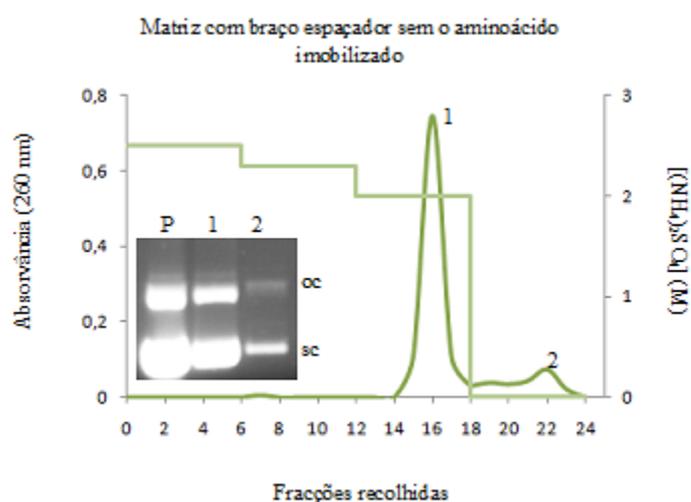



Figura 38 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de Sepharose com a respectiva electroforese em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna. 1- Fracção recolhida usando 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$. 2- Fracção recolhida usando Tris-HCl.

A coluna foi equilibrada com 2,5 M de $(NH_4)_2SO_4$ em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH =8,0). Após a aplicação do pDNA, verifica-se que o pDNA ficou retido a 2,5 M e a 2,3 M de $(NH_4)_2SO_4$ (figura 38). Foi realizado um passo de eluição a 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ (linha 1 da figura 38) destinada a eluir as espécies com baixa afinidade. A eluição das espécies que se ligaram foi realizada seguidamente com a aplicação do tampão Tris-HCl (linha 2 da figura 38). As fracções foram agrupadas de acordo com os cromatogramas obtidos e analisados por electroforese em gel de agarose. Verifica-se que ambas as isoformas do plasmídeo eluíram maioritariamente a 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$, havendo outra eluição com Tris-HCl. Ao testar estas condições verificou-se que houve interacção do pDNA com a matriz, devendo-se à extensão do braço espaçador, uma vez que, quanto

maior for o braço espaçador maior será a retenção do pDNA usando elevadas concentrações de sal.

III. 2. 3. Comparação das condições de retenção para cada matriz de histidina

Antes da execução dos ensaios para tentar separar as diferentes isoformas do pDNA, procedeu-se à realização de ensaios cromatográficos de modo a comparar as condições de retenção/eluição da matriz não modificada e das modificadas. Deste modo, foram aplicadas diferentes estratégias utilizando sempre um gradiente decrescente (por passos) de concentração de $(NH_4)_2SO_4$.

Histidina – Sepharose

A escolha desta matriz, que contém a histidina como aminoácido imobilizado (figura 39), teve como objectivo a comparação das condições de retenção e eluição do pDNA entre esta matriz, com as matrizes derivadas da histidina por introdução de novos grupos.

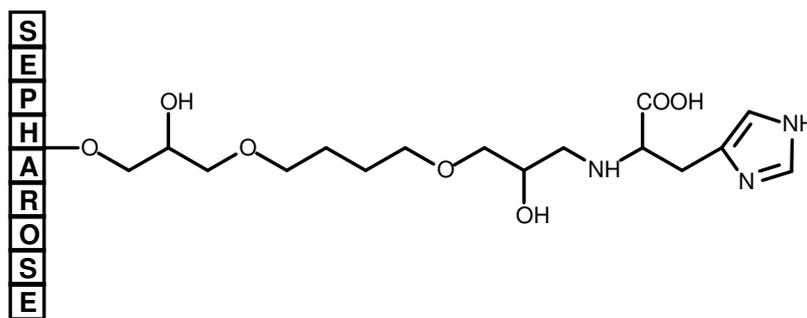



Figura 39 Representação esquemática da matriz de histidina – Sepharose.

Começou-se por testar as seguintes condições: 2,3 M de $(NH_4)_2SO_4$, 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$, seguido da adição do tampão Tris-HCl porque, segundo trabalhos já publicados, a isoforma oc do pDNA elui a 2,3 M de $(NH_4)_2SO_4$ e a 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ elui a isoforma sc [155].

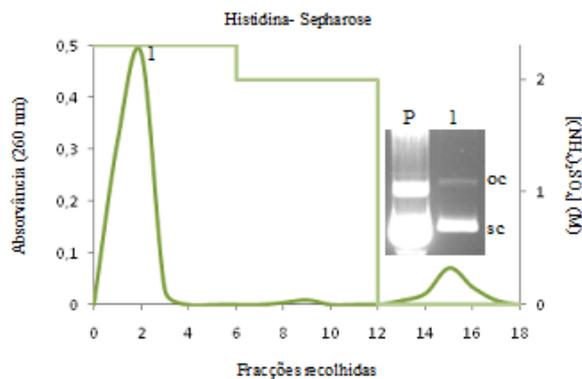
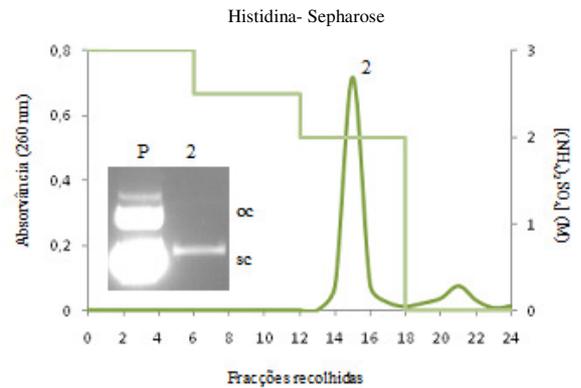



Figura 40 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de histidina - Sepharose com a respectiva electroforese em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna. 1- Fracção recolhida usando 2,3 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio A . 2- Fracção recolhida usando 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio B.

Com se pode visualizar pelo cromatograma da figura 40 A, não há interacção do pDNA com esta matriz, uma vez que o pDNA eluiu logo a 2,3 M de $(NH_4)_2SO_4$ (linha 1). Deste modo aumentou-se a concentração de sal para 3,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ para compreender a retenção (figura 40 B) e, verificou-se que houve ligação total do pDNA para as concentrações mais altas de sal, nomeadamente: 3,0 M e 2,5 M, sendo que a sua eluição só ocorreu com a aplicação da concentração de 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$. Pode-se concluir, através da análise destes perfis cromatográficos, que o aumento da concentração de sal favorece as ligações entre o pDNA e a matriz de histidina, sendo possível a retenção do pDNA na coluna. Quando se diminui a força iónica para 2,0 M, o pDNA eluiu indiferenciadamente (linha 2), ocorrendo uma diminuição da intensidade das interacções. Segundo estudos atómicos, foi recentemente demonstrado que determinados aminoácidos podem promover interacções específicas com as bases dos ácidos nucleicos. Devido ao facto da histidina interagir com os nucleótidos [149], torna este aminoácido capaz de reter e interagir com o DNA na coluna. Relativamente ao tipo exacto de interacções que poderiam estar a ocorrer, estas podem incluir (i) ligações de hidrogénio entre o átomo doador de H ($N\tau H$) e o átomo aceitador de H ($N\pi$) na histidina não protonada com as arestas das bases; (ii) emparelhamento com o anel imidazol/interacções hidrofóbicas; (iii) ligações de hidrogénio mediadas pela água [150]. Assim, a eluição das isoformas do pDNA quando a concentração de sal diminui sugere que o emparelhamento das bases com o anel imidazol/interacções hidrofóbicas

são os efeitos dominantes. É de referir que, na electroforese (linha 2) não se visualiza muito bem a isoforma oc do pDNA devido ao facto de se ter diluído muito a solução com o tampão Tris-HCl.

Éster metílico da histidina – Sepharose

Na figura 41 está representada a matriz de éster metílico da histidina – Sepharose, que foi obtida pela ligação da histidina metil esterificada, à Sepharose pelo *bis*-epóxido.

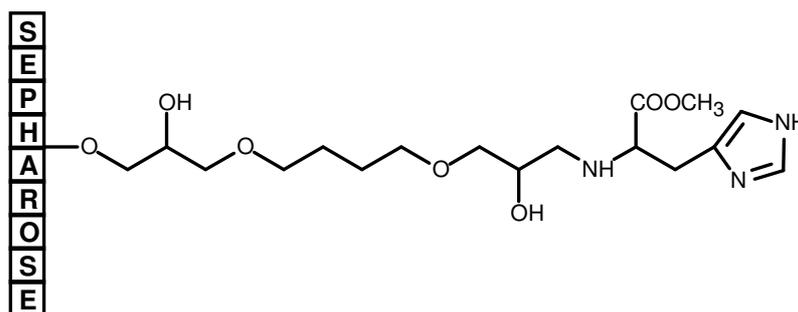



Figura 41 Representação esquemática da matriz de éster metílico da histidina – Sepharose.

Os ensaios que se apresentam de seguida têm como objectivo verificar se, a introdução do grupo metilo contribui ou não para o aumento do tempo de retenção da molécula-alvo na matriz. Na figura 42 A utilizaram-se as seguintes condições: 2,5 M de $(NH_4)_2SO_4$, 2,3 M de $(NH_4)_2SO_4$, 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ e Tris-HCl e na figura B estão representadas as condições de 3,0 M de $(NH_4)_2SO_4$, 2,5 M de $(NH_4)_2SO_4$, 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ e Tris-HCl.

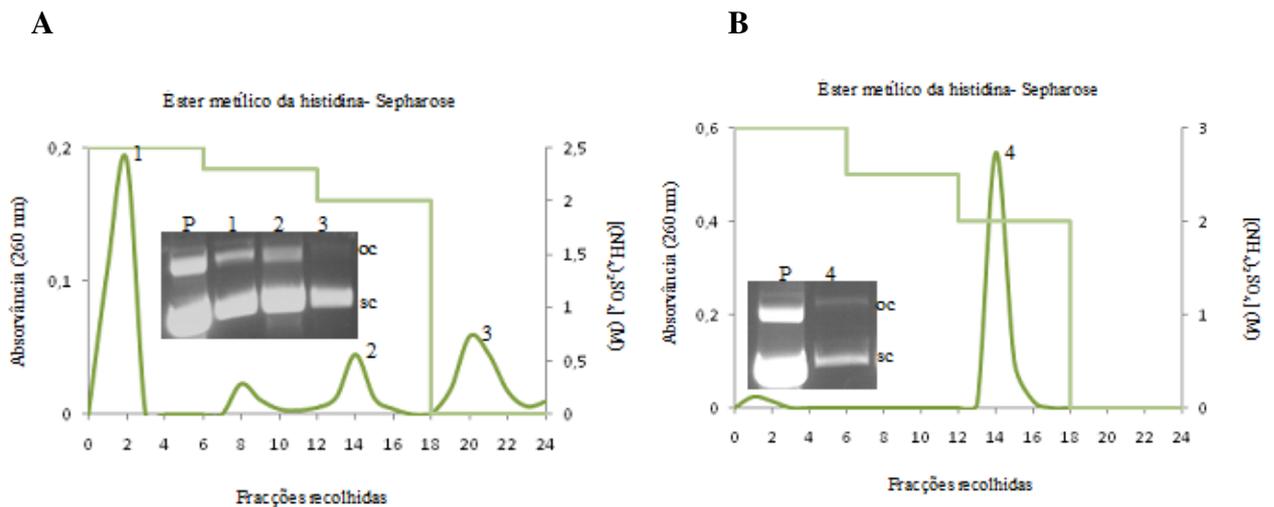



Figura 42 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de éster metílico da histidina - Sepharose com a respectiva electroforese em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna. 1- Fracção recolhida usando 2,5 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio A . 2- Fracção recolhida usando 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio A. 3- Fracção recolhida usando Tris-HCl do ensaio A. 4- Fracção recolhida usando 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ do ensaio B.

Após a aplicação da primeira estratégia para verificar as condições que favoreciam a retenção/eluição do pDNA utilizando esta matriz, verificaram-se que as condições de retenção/eluição do pDNA não foram eficientes, uma vez que, como se constata pela figura 42 A, o pDNA eluiu logo após a adição da concentração de 2,5 M de $(NH_4)_2SO_4$ (pico 1, linha 1). Com a diminuição da força iónica verifica-se a formação de mais dois picos, representando a eluição do pDNA a 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ (linha 2) e com o tampão Tris-HCl (linha 3). Num segundo ensaio e, de modo a promover interacções da molécula com a matriz, aumentou-se a concentração para 3,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ e verificou-se que esta estratégia foi eficaz. Como se pode visualizar pela figura 42 B, o pDNA ficou retido nessa concentração, eluindo totalmente a 2,0 M do mesmo sal (linha 4).

Após a realização de vários ensaios verifica-se que ambas as matrizes apresentam as mesmas condições de retenção/eluição ou seja, o pDNA liga-se a 3,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ e elui a 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$ (ver tabela 8). Com este resultado surgiu o interesse de tentar separar as diferentes isoformas do pDNA com as matrizes de histidina nesta gama de concentrações, a fim de desenvolver uma estratégia de purificação.

Tabela 8 Quadro resumo sobre as condições de retenção e de eluição da histidina e derivado

	Retenção ($(NH_4)_2SO_4$ (M))	**Eluição $(NH_4)_2SO_4$ (M)**
Histidina - Sepharose	3,0	2,0
Éster metílico da histidina - Sepharose	3,0	2,0

Comparando o ensaio do branco (figura 38) com os ensaios realizados utilizando as matrizes de histidina – Sepharose (figura 40) e de éster metílico da histidina – Sepharose (figura 42), constata-se que têm um comportamento semelhante. Ocorre interacção do pDNA com as matrizes a elevadas concentrações de sal e, à medida que a força iónica diminui o pDNA elui. No entanto, é de referir que, na matriz de Sepharose só com o braço espaçador (figura 38), o pDNA liga a 2,5 M de sal, eluíndo a 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$, ao passo que nas restantes matrizes (figura 40 e 42), a molécula alvo retém a 3,0 M de $(NH_4)_2SO_4$, eluindo a 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$. Deste modo pode-se afirmar que, o pDNA interage preferencialmente com as matrizes representadas nas figuras 40 e 42, do que na matriz representada na figura 38.

Concluísse também que, ao aumentar a cadeia alquílica da matriz não há favorecimento da interacção do pDNA com as matrizes. Este facto poderá ser explicado pelo baixo rendimento obtido aquando da imobilização destas matrizes (histidina – Sepharose e éster metílico da histidina – Sepharose). Este acontecimento vai originar uma reduzida percentagem de ligandos imobilizados induzindo fracas interacções do pDNA com as respectivas matrizes.

No entanto, com base nestes resultados testou-se ainda a possibilidade de separar as diferentes isoformas do pDNA com as matrizes de histidina nesta gama de concentrações, a fim de desenvolver uma estratégia de purificação.

III. 2. 4. Separação das diferentes isoformas do DNA plasmídico

No decurso dos processos de produção e recuperação, o plasmídeo pode sofrer alterações de conformação que serão responsáveis pela maior ou menor actividade biológica apresentada pelo plasmídeo final. Assim, apesar de ser produzida maioritariamente a isoforma plasmídica mais compacta e de maior actividade biológica

(isoforma sc), [110] outras isoformas como oc, linear e desnaturada, poderão estar presentes podendo ser estas ultimas menos eficientes na expressão do gene a transferir. Por esta razão as agências reguladoras especificam que o pDNA usado como produto terapêutico deverá apresentar-se quase totalmente (mais de 97%) na conformação de sc [164].

A capacidade da histidina, como ligando imobilizado na cromatografia de afinidade, foi recentemente demonstrada na separação das isoformas oc e sc do pDNA, tanto em amostras obtidas por isolamento com kits comerciais, como a partir de um lisado de *E. coli* [153,155], usando um gradiente decrescente de sulfato de amónio. Os resultados mostraram que não foi reconhecido a isoforma oc do pDNA e gDNA, ao passo que a isoforma sc interagiu especificamente com o ligando. Uma vez que a interacção da histidina com as bases do DNA podem incluir ligações por pontes de hidrogénio, “ring stacking” (empilhamento) / interacções hidrofóbicas e ligações de hidrogénio mediadas pela água, o mecanismo por detrás da interacção específica com as bases da isoforma sc foi explicada como uma consequência de deformações induzidas pela torção da cadeia. O maior grau de exposição das bases da isoforma sc favorece a interacção com a histidina e, a avaliação da eficiência da cromatografia com base na histidina para purificar pDNA não está completa sem um controlo rigoroso da qualidade do plasmídeo. Assim, o plasmídeo obtido utilizando esta técnica de purificação foi caracterizado, sendo garantida a sua qualidade por meio da redução do gDNA e endotoxinas para níveis aceitáveis [153].

Baseando-nos nestes resultados e, uma vez já estabelecidas as condições que favorecem a retenção/eluição do pDNA procedeu-se à tentativa de separar as diferentes isoformas.

Éster metílico da histidina – Sepharose

Trabalhando na gama anteriormente referida, fixou-se um gradiente por passos entre 3,0 M e 2,0 M, estabelecendo-se esta gama de concentrações para testar a eluição diferenciada das duas isoformas do pDNA. De seguida apresenta-se o perfil cromatográfico desta estratégia e a respectiva electroforese indicando as espécies que eluiram.

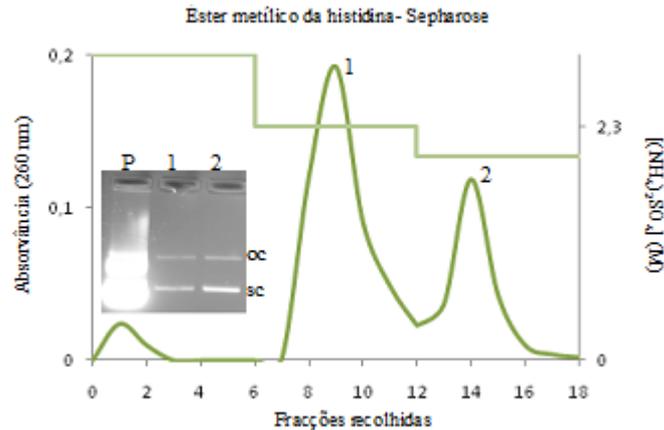



Figura 43 Perfil cromatográfico obtido após injecção de pDNA (oc + sc) utilizando um suporte de éster metílico da histidina - Sepharose com a respectiva electroforese em gel de agarose a 1%. P- Amostra de pDNA injectado na coluna. 1- Fracção recolhida usando 2,3 M de $(NH_4)_2SO_4$. 2- Fracção recolhida usando 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$.

Neste ensaio cromatográfico (figura 43), obtiveram-se dois picos em que o primeiro corresponde às espécies eluídas quando se utilizou 2,3 M de $(NH_4)_2SO_4$, e o segundo corresponde à eluição de 2,0 M de $(NH_4)_2SO_4$. Apesar de se obter dois picos, não se obteve diferenciação na eluição das diferentes isoformas como se pode visualizar através das linhas 1 e 2.

A impossibilidade de separar as duas isoformas do pDNA nestas condições pode estar associada ao facto de a matriz não apresentar elevada percentagem de ligandos imobilizados. Este factor já se revelou importante nos estudos de ligação/eluição, uma vez que não se verificaram diferenças de comportamento de retenção do pDNA entre esta matriz e a matriz de Sepharose só com o braço espaçador (sem o ligando derivado de aminoácido).

O facto de estes estudos serem realizados em colunas "de bancada", sem o controlo da temperatura também pode influenciar o resultado, na medida em que a separação das isoformas requer um controlo rigoroso de todos os parâmetros. Para melhorar os resultados e eventualmente atingir o objectivo de separar a isoforma sc da oc poderiam iniciar-se os estudos num sistema que permita o controlo de condutividade e temperatura.

CAPÍTULO IV

(Conclusões gerais e Perspectivas futuras)

O processo de produção do pDNA está geralmente associado à fermentação (crescimento de culturas de *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse), sendo um processo que conduz à produção não só do plasmídeo mas também de todo um conjunto de componentes celulares do hospedeiro (gDNA, RNA, proteínas e endotoxinas). Como estes componentes possuem a capacidade de induzir respostas imunológicas e biológicas indesejáveis devem ser eliminados ao longo de purificação [10]. A purificação de plasmídeos exige também a remoção de qualquer substância usada ao longo do processamento que possa induzir efeitos tóxicos aquando da sua utilização posterior em estudos de transfecção [163].

A realização deste trabalho demonstra que o plasmídeo pVAX1-*LacZ* (6,05 kpb) foi inserido e amplificado na *E. coli* DH5 α. Após a produção do pDNA por fermentação, a recuperação pode ser feita utilizando várias técnicas como a precipitação por surfactantes ou extracção de sistema por duas fases aquosas, mas a cromatografia é a técnica preferida para realizar uma preparação final de plasmídeo com o desejado grau de purificação [10].

Foram efectuados vários passos de retenção/eluição de modo a determinar as condições específicas de ligação do pDNA. As diversas experiências realizadas para estabelecer essas condições revelaram extrema sensibilidade do comportamento de retenção/eluição do pDNA no que diz respeito à força iónica do tampão utilizado. Verificou-se que uma ligeira alteração na concentração de NaCl pode modificar a retenção do plasmídeo.

A introdução de pequenas cadeias alquílicas como os ésteres metílico e etílico da arginina induz uma maior retenção do plasmídeo. As cadeias alquílicas de maior comprimento (éster hexílico da arginina – Sepharose e éster octílico da arginina – Sepharose) desfavorecem a interacção com o plasmídeo nos casos em que se utilizaram tampões de eluição com baixa força iónica, não favorecendo as interacções electrostáticas. Então efectuou-se outro estudo utilizando elevadas concentrações de $(NH_4)_2SO_4$ para explorar a possibilidade de ocorrência de outro tipo de interacção, como interacções hidrofóbicas, entre o pDNA e as matrizes de cadeia alquílica de maior tamanho. Verificou-se que utilizando estas condições houve interacção do pDNA com as respectivas matrizes.

Concluí-se assim que, as matrizes que apresentam a cadeia alquílica de maior tamanho, causam uma diminuição da retenção, para baixas concentrações de sal, possivelmente

devido a um impedimento estereoquímico, mas explorando a interacção hidrofóbica que envolvem estas cadeias é possível promover a interacção com o pDNA.

Ao se tentar separar as diferentes isoformas do pDNA verificou-se que os resultados não foram totalmente satisfatórios. É necessário melhorar as condições de forma a obter a isoforma sc do pDNA purificada.

Ainda estão em desenvolvimento estudos conducentes à caracterização das interacções induzidas pelos ligandos modificados da histidina e arginina.

A implementação de novas estratégias terapêuticas é parcialmente dependente da evolução da tecnologia do pDNA. Devido à singularidade do plasmídeo, a sua eficiente purificação ainda é um desafio, contudo, as estratégias de purificação utilizando aminoácidos como ligandos foram produzindo resultados interessantes no que diz respeito à purificação de plasmídeos.

Para melhorar as condições de purificação do pDNA, propõe-se a realização de estudos de purificação em sistemas como por exemplo o FPLC, uma vez que este sistema permite controlar parâmetros como a temperatura, condutividade, entre outros, que podem ser importantes na separação de componentes estrutural e quimicamente semelhantes.

CAPÍTULO V

(Bibliografia)

[1] European Federation of Biotechnology (1994) EFB Newsletter.

[2] EFB General Assenbly (1989) EFB Newsletter.

[3] Flaschel, E., Friehs, E.K. (1993). Improvement of downstream processing of recombinant proteins by means of genetic engineering methods. *Biotech. Adv.,* vol 11, pp. 31-78.

[4] Ferreira, E.C. (1995). *Identificação e Controlo Adaptativo de Processos Fermentativos*. Dissertação de doutoramento, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto.

[5] Lima, N., Mota, M. (2003). *Biotecnologia, Fundamentos e Aplicações*, Lidel – edições técnicas, lda.

[6] Doran, P. M.(1999). *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press, New York, pp. 218-253.

[7] Goldberg, E.(1997). Handbook of Downstream Processing, Chapman & Hall.

[8] Prather, K.J., Sagar, S., Murphy, J., Chartrain, M.(2003). Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene theraphy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme Microb. Technol*., vol.33, pp. 865-883.

[9] Stadler, J., Lemmens, R., Nyhammar, T. (2004). Plasmid DNA purification. *J. Gene Med.*, vol. 6, pp. 54–66.

[10] Diogo, M.M., Queiroz, J.A., Prazeres, D.M.F. (2005). Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A,* vol. 1069, pp. 3-22.

[11] Liu, M. A. (2003). DNA vaccines: a review. *J. Int Med*, vol. 253, pp. 402–410.

[12] US FDA. (1996). Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications. US Food and Drug Administration, Rockville, MD.

[13] WHO Guidelines for Assuring the Quality of DNA vaccines. (1998). *Biologicals*, vol. 26, pp. 205-212.

[14] Cichutek, K. (2000). DNA vaccines: development, standardization and regulation. *Intervirology.,* vol. 43, pp. 331–338.

[15] Robertson, J.S., Cichutek, K. (2000). European Union Guidance on the quality, safety and efficacy DNA vaccines and regulatory requirements. *Dev. Biol.,* vol 104, pp. 53–56.

[16] Falk, L.A., Ball, L.K. (2001). Current status and future trends in vaccine regulation—USA. *Vaccine*, vol 19, pp. 1567–1572.

[17] Smith, H.A.(1994). Regulatory considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine.,* vol 12, pp. 1515–1519.

[18] Smith, H.A. (2000). Regulatory and reviews of DNA vaccine products. *Dev. Biol.,*vol. 104, pp. 57–62.

[19] Smith, H.A. (2001). The regulation of DNA vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol*., vol. 12, pp. 299–303.

[20] Crystal, R.G. (1995). The gene as the drug. *Nat. Med.,* vol. 1, pp. 15–17.

[21] FDA (1996). Addendum to the points to consider in human somatic cell and gene therapy. In: Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventing Infectious Disease Indications. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

[22] Dufes,C., Uchegbu, I.F., Schatzlein, A.G. (2005). Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.,* vol. 57, pp. 2177-2202.

[23] Lampela, P., Soininen, P., Urtti, A., Mannisto, P.T., Raasmaja, A.(2004). Synergism in gene delivery by small PEIs and three different nonviral vectors. *Int. J. Pharmaceut.,* vol. 270, pp. 175-184.

[24] Bonadio, J., Smiley, E., Patil, P., Goldstein, S. (1999). Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat. Med.,* vol. 5, pp. 753-759.

[25] Cohen-Sacks, H., Elazar, V., Gao, J.C., Golomb, A., Adwan, H., Korchov, N., Levy, R.J., Berger, M.R., Golomb, G. (2004). Delivery and expression of pDNA embedded in collagen matrices. *J. Controlled Rel.,* vol. 95, pp. 309-320.

[26] Hosseinkhani, H., Inatsugu, Y., Hiraoka, Y., Inoue, S., Shimokawa, H., Tabata, Y. (2005). Impregnation of plasmid DNA into three-dimensional scaffolds and medium

perfusion enhance in vitro DNA expression of mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.,* vol. 11, pp. 1459-1475.

[27] Templeton, N.S. (2002). Liposomal delivery of nucleic acids in vivo. *DNA and Cell Biol.,* vol. 21, pp. 857-867.

[28] Tomlinson, E., Rolland, A.P. (1996). Controllable gene therapy - Pharmaceutics of non-viral gene delivery systems. *J. Control. Release,* vol. 39, pp. 357-372.

[29] Anderson, W.F. (1998) Human gene therapy. *Nature,* vol. 392, pp. 25–30.

[30] Luo, D., Saltzman, W.M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.,* vol. 18, pp. 33–37.

[31] Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell,* vol. 110, pp. 521–529.

[32] Nakai, H., Montini, E., Fuess, S., Storm, T.A., Grompe, M., Kay, M.A. (2003). AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat. Genet.,* vol. 34, pp. 297–302.

[33] Mountain, A. (2000). Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol.,* vol. 18, pp. 119–128.

[34] Prazeres, D.M.F., Monteiro, G.A., Ferreira, G.N.M., Diogo, M.M., Ribeiro, S.C., Cabral, J.M.S., El-Gewely, M.R. (2001). *Biotechnol. Annual Review*, Elsevier, Amsterdam, p. 1.

[35] Chattergoon, M., Boyer, J., Weiner, D. (1997). Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *FASEB,* vol.11, pp. 753–63.

[36] Wolf, J., Malone, R., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vitro. *Science,* vol. 247, pp. 1465–1468.

[37] Danko, I., Wolff, J. (1994). Direct gene transfer into muscle. *Vaccine,* vol.12, pp. 149–1502.

[38] Marcel, T., Grausz, J.D. (1997). The TCM worlwide gene therapy envolment report, end 1996. *Human Gene Ther.*, vol. 8, pp. 775-800.

[39] Ross, G., Erickson, R., Knorr, D., Matulsky, A.G., Parkman, R., Samulski, J. (1996). Gene therapy in the United States: A five years status report. *Human Gene Ther.*, vol. 7, pp. 1781-1790.

[40] Ulmer, J.B., Sadoff, J.C., Liu, M.A.(1996). DNA vaccines. *Curr Opin Immunol.*, vol. 8, pp. 531–536.

[41]Forde, G.M. (2005). Rapid-response vaccines—does DNA offer a solution? *Nat. Biotechnol.,* vol. 23, pp. 1059–1062.

[42] Prazeres, D.M.F., Ferreira, G.N.M., Monteiro, G.A., Cooney, C.L., Cabral, J.M.S. (1999). Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene theraphy: problems and bottlenecks. *Trends Biotechnol*., vol. 17, pp. 169-174.

[43] Przybylowski, M., Bartido, S., Borquez-Ojeda, O., Sadelain, M., Riviére, I. (2007). Production of clinical-grade plasmid DNA for human phase I clinical trials and large animal clinical studies. *Vaccine,* vol. 25, pp. 5013–5024.

[44] Prazeres, D.M.F., Ferreira, G.N.M. (2004). Design of flow sheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chem. Eng. Process.,* vol. 43, pp. 609–624.

[45] Urthaler, J., Schlegl, R., Podgornik, A., Strancar, A., Jungbauer, A., Necina, R. (2005). Application of monoliths for plasmid DNA purification development and transfer to production. *J. Chromatogr. A,* vol. 1065, pp. 93–106.

[46] Boles, T.C., White, J.H., Cozzarelli, N.R. (1990). Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.,* vol. 213, pp. 931-951.

[47] Sinden, R.R. (1994). *DNA Structure and Function*, Academic Press, Inc., San Diego, USA.

[48] Summers, D.K. (1996). *The Biology of Plasmids*, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.

[49] Vologodskii, A.V., Levene, S.D., Klenin, K.V., Frank-Kamenetskii, M., Cozzarelli, N.R. (1992). Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.,* vol. 227, pp. 1224-1243.

[50] Murphy, J.C., Wibbenmeyer, J.A., Fox, G.E., Willson, R.C. (1999). Purification of plasmid DNA using selective precipitation by compactation agents. *Nature Biotechnol.,* vol. 17, pp. 822-823.

[51] Han, Y., Liu, S., Ho, J., Danquah, M.K., Forde, G.M. (2009). Using DNA as a drug- Bioprocessing and delivery strategies. *Chemical Eng. Research and Design*, vol. 87, pp. 343-348.

[52] Wang, Z., Le, G., Shi, W., Wegrzyn, G. (2001). Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. *Process Biochem.*, vol. 36, pp. 1085–1093.

[53] Mor, G. (1998). Plasmid DNA, a new era in vaccinology. *Biochem. Pharm.*, vol. 55, pp. 1151–1153.

[54] Robinson, H., Hunt, L., Webster, R. (1993). Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine*, vol. 11, pp. 957–60.

[55] Kieny, M.P., Costa, A., Hombach, J., Carrasco, P., Pervikov, Y., Salisbury, D., Greco, M., Gust, I., LaForce, M., Franco-Paredes, C., Santos, J.I., D'Hondt, E., Rimmelzwaan, G., Karron, R., Fukuda, K. (2006). A global pandemic influenza vaccine action plan. *Vaccine*, vol. 24, pp. 6367–6370.

[56] Summers, D. K. (1996). *The Biology of Plasmids*, Blackwell Science Ltd, Oxford, U.K.

[57] Horn, N.A., Meek, J.A., Budahazi, G., Marquet, M. (1995). Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. *Hum. Gene Therapy*, vol. 6, pp. 565-573.

[58] Varley, D.L., Hitchcock, A.G., Weiss, A.M., Horler, W.A., Cowell, R., Peddie, L., Sharpe, G.S., Thatcher, D.R., Hanak, J.A. (1999). Production of plasmid DNA for human gene therapy using modified alkaline cell lysis and expanded bed anion exchange chromatography. *Bioseparation*, vol. 8, pp. 209–217.

[59] Lemmens, R., Olsson, U., Nyhammar, T., Stadler, J. (2003). Supercoilded plasmid DNA: selective purification by thiophilic/aromatic adsorption. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* vol. 784, pp. 291-300.

[60] Branovic, K., Forcic, D., Ivancic, J., Strancar, A., Barut, M., Gulija, T.K., Zgorelec, R., Mazuran, R. (2004). Application of short monolithic columns for fast purification of plasmid DNA. *J. Chromatog. B*, vol. 801, pp. 331–337.

[61] Kelly, B.D., Hatton, T.A. (1991). The fermentation downstream processing interface. *Bioseparation,* vol. 1, pp. 333–349.

[62] Doran, P. M. (1999). *Bioprocess Engineering Principles,* Academic Press, New York, pp. 218-253.

[63] Goldberg, E. (1997). *Handbook of Downstream Processing*, Chapman & Hall.

[64] Swartz, J. (1996). *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In: Neidhardt F, editor. *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and molecular biology*, Washington DC: ASM Press; pp.1693-711.

[65] Swartz, J. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol*., vol. 12, pp.195 – 201.

[66] Riesenber, D. (1991). High-cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.*, vol. 2, pp. 380-384.

[67] Zabriskie, D., Arcuri, E.(1986). Factors influencing the productivity of fermentations employing recombinat microorganisms. *Enz. microbial Technol.*, vol.8, pp. 706-717.

[68] Yee, L., Blanch, H.W. (1992). Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol. (NY)*, vol. 10, pp. 1550-1556.

[69] Lee, S.Y.(1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*., vol. 14, pp. 98-105.

[70] Pan, J., Rhee, J., Lebeault, J.(1987). Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnol Lett.*, vol. 9, pp. 89-94.

[71] Luli, G.W., Strohl, W.R. (1990). Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. A*ppl Environ Microbiol.*, vol. 56, pp. 1004-1011.

[72] Cherrington, C.A., Hinton, M., Chopra, I. (1990). Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol.*, vol. 68, pp. 69-74.

[73] Chen, W., Frazen, P.A. (1999). Automated high-yield fermentation of plasmid DNA in *Escherichia coli*. *United States Patent*, No- 5955323, Sep.21.

[74] Belo, I., Santos, J.A.L., Cabral, J.M.S., Mota, M. (1996) Optimization of bead mill disruption of *Escherichia coli* TB 1 cells for cytochrome b5 recovery. *Biotechnol. Prog.*, vol. 4, pp. 15-21.

[75] Schutte, H., Kula, M.R (1993). Cell disruption and isolation of non-secreted products. *In: Stephanopoulos (Ed) Biotechnology: bioprocessing*., vol.3, pp.505-526.

[76] Kennedy, J. F., Cabral, J.M.S. (1993). *Recovery Processes for Biological Materials*, John Wiley & Sons, New York.

[77] Prave, P., Faust, U., Sittig, W., Sukatsch, D. A. (1987). *Basic Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 279-321.

[78] Levy, M.S. (1999). Effect of shear on plasmid DNA solution. *Bioprocess Eng.* vol. 20, pp. 7–13.

[79] Ciccolini, L.A. *et al*. (1998) Time course of SDS–alkaline lysis of recombinant bacterial cells for plasmid release. *Biotechnol. Bioeng.* vol. 60, pp. 768–770.

[80] Ettre, L. S. (2000). Chromatography: the separation technique of the 20th century. *Chromatog.*, vol. 51, pp. 7-17.

[81] Garcia, F. A. P., Pires, E. M. V. (1993). *Recovery Processes for Biological Materials*, John Wiley & Sons, New York.

[82] Narayanan, S.R. (1994). Preparative affinity chromatography of proteins. *J. Chromatogr.,A.*, vol. 658, pp. 237-258.

[83] Diogo, M. M., Queiroz, J. A., Monteiro, G. A., Martins, S. A., Ferreira, G. N., Prazeres, D. M. F.(2000). Purification of a Cystic Fibrosis Plasmid Vector for Gene Therapy Using Hydrophobic Interaction Chromatography. *Biotechnol. and Bioengineering*, vol. 68, pp. 576-583.

[84] Jungbauer, A. (2005). Hydrophobic interaction chromatography of proteins. III. Unfolding of proteins upon adsorption. *J. Chromatogr. A.* vol. 1079, pp. 221–228.

[85] Xiao, Y. (2007). Generalizing a two-conformation model for describing salt and temperature effects on protein retention and stability in hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* vol. 1157, pp. 197–206.

[86] Van Oss, C.J., Good, R.J., Chaudhury, M.K. (1986). The role of Van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interaction” between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid Interface Sci*., vol. 111, pp. 378–390.

[87] Narhi, L.O., Kita, Y., Arakawa, T. (1989). hydrophobic interaction cromatography in alkaline pH. *Anal. Biochem*., vol. 182, pp. 266-270.

[88] Commings, D. E., Miguel, A.G., Lesser, B. H. (1979). Nuclear proteins. VI. Fractionation of chromosomal non-histone proteins using hydrophobic chromatography. *Biochem. Byophys. Acta*, Amsterdam, vol. 563, pp.253-260.

[89] Hrkal, Z., Rejnková, L. (1982). Hidrophobic interaction chromatography of serum proteins on Phenyl-Sepharose CL-4B. *J. Chromatogr.*, vol. 242, pp.385-388.

[90] Lefort, S., Ferrara, P. (1986). Hydorphobic adsorbents for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude fermentation misture. *J. Chromatogr.*, vol. 361, pp. 209-216.

[91] Angelova, M. K., Dimov, N. P., Nachev, N. D., Tsvetkov, A. B. (1997). Preparative hydrophobic interaction chromatography as effective stage in the purification of glucagon and insulin. *Bulg. Chem. Commun.*, vol . 29, pp. 90-100.

[92] Queiroz, J.A., Garcia, F.A.P., Cabral, J.M.S. (1999). Purification of *Chromobacterium viscosum* lipase by hydrophobic interaction chromatography. *Isol. Purif.*, vol. 3, pp. 1-7.

[93] Diogo, M.M., Ribeiro, S.C., Queiroz, J.A., Monteiro, G.A., Tordo, N., Perrin, P., Prazeres, D.M.F. (2001). Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies. *J. Gene Med.*, vol. 3, pp. 577–584.

[94] Li, Y., Dong, X., Sun, Y. (2005). High-speed chromatographic purification of plasmid DNA with a customized biporous hydrophobic adsorbent. *Biochem. Eng. J.*, vol. 27, pp. 33–39.

[95] Deshmukh, N.R., Lali, A.M. (2005). Adsorptive purification of pDNA on superporous rigid cross-linked cellulose matrix. *J. Chromatogr.* B., vol. 818, pp. 5–10.

[96] Ferreira, G.N., Monteiro, G.A., Prazeres, D.M.F., Cabral, J.M.S.(2000). Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol.*, vol. 18, pp. 380–388.

[97] Luliano, S., Fischer, J.R., Chen, M., Kelly, W.J. (2002). Rapid analysis of a plasmid by hydrophobic-interaction chromatography with a non-porous resin. *J. Chromatogr. A.*, vol. 972, pp. 77–86.

[98] Diogo, M.M., Queiroz, J.A., Prazeres, D.M.F. (2003). Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.*, vol. 998, pp. 109–117.

[99] Sofer, G., Hagel, L. (1997). *Handbook of Process Chromatography: A Guide to Optimization, Scale-Up and Validation*, Academic Press, San Diego, USA.

[100] Brown, P. R., Krstulovic, A.M. (1979). Pratical aspects of revesed-phase liquid chromatography applied to biochemical and biomedical research. *Anal. Biopchem.,* vol. 99, pp. 1-21.

[101] Meyer, V. R. (1994). *Pratical High-Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., West Sussex, U.K.

[102] Xindu, G., Wang, L. (2008). Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs. *J. Chromatog. B*, vol. 866, pp. 133–153.

[103] Ejima, D., Yumioka, R., Arakawa, T., Tsumoto, K. (2005). Arginine as an effective additive gel permeation chromatography. *J. Chromatogr. A.*, vol. 1094, pp. 49-55.

[104] Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.*, vol. 28, pp. 1-8.

[105] Georgiou,G., Segatori, L. (2005). Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 16, pp. 538-545.

[106] Carvin, J. (1991). *Giddings Unified Separation Science*, A Wiley-Interscience Pub. John & Sons, Inc., New York.

[107] Huber, C.G. (1998). Micropellicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA. *J. Chromatogr. A.*, vol. 806, pp. 3–30.

[108] Lyddiatt, A., O´Sullivan, D. (1998). Biochemical recovery and purification of gene teraphy vectors. *Biochemical Eng.,* vol. 9, pp. 177-185.

[109] Eon-Duval, A., Burke, G. (2004). Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life* Sci., vol. 804, pp. 327–335.

[110] Prazeres, D.M.F., Schluep, T., Cooney, C. (1998). Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A.*, vol. 806, pp.31–45.

[111] Yamakawa, H., Higashino, K-i., Ohara, O. (1996). Sequence Dependent DNA Separation by Anion-Exchange High-performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.*, vol. 240, pp. 242-250.

[112] Lahijani, R., Hulley, G., Soriano, G., Horn, N.A.M. (1996). High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. *Hum Gene The*r., vol. 7, pp. 1971–1980.

[113] Marquet, M., Horn, N.A., Meek, J.A., Pestka, S.(1995). Process development for the manufacture of plasmid DNA vectors for use in gene therapy. *BioPharm.*, vol. 20, pp. 26–37.

[114] Colpan, M., Riesner, D.(1984). High-performance liquid chromatography of high molecular weight nucleic acids on the macroporous ion exchanger nucleogen. *J Chromatogr.*, vol. 296, pp. 339–353.

[115] Lowe, C.R, Lowe, A.R., Gupta, G. (2001). New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. *J. Biochem. Biophys.* Methods, vol. 49, pp. 561–574.

[116] Kanoun, S., Amourache, L., Krishnan, S., Vijayalakshmi, M.A. (1986). New support for the large-scale purification of proteins. *J. Chromatogr.*, vol. 376, pp. 259–267.

[117] Schiel, J.E. (2006) Applications of silica supports in affinity chromatography. *J. Sep. Sci.* vol.29, pp. 719–737.

[118] *Affinity Chromatography – Principles and Methods,* Amersham Biosciences.

[119] Clonis, Y.D. (2006). Affinity chromatography matures as bioinformatic and combinatorial tools develop. *J. Chromatogr.,* A, vol. 1101, pp. 1-24.

[120] Mondal, K., Gupta, M.N. (2006). The affinity concept in bioseparation: envolving paradigms and expanding range of applications. *Biomol.* Eng., vol. 23, pp. 59–76.

[121] K. Jones, *"Affinity separation"*. (2000). In *Encyclopedia of separation science*, London, Academic Press, Inc., Wilson I. D., Cooke M., Poole C. F., Adlard R. E., editors., vol. 1.

[122] Platonova, G.A., Tennikova, T.B. (2005). Chromatographic investigation of macromolecular affinity interactions. *J. Chromatogr. A.*, vol. 1065, pp. 75–81.

[123] Han, Y., Forde, G.M. (2008). Single step purification of plasmid DNA using peptide ligand affinity chromatography. *J. Chromatogr. B*, vol. 874, pp. 21–26.

[124] Boto, R. E. F. (2007). *Synthesis and Characterization of Carboxycarbocyanines and Their Application as Ligands in Dye-Affinity Chromatography for Protein Purification,* Tese de Doutoramento, Universidade da Beira Interior, Covilhã.

[125] Pardal, A. C. (2009). *Cianinas como Ligandos para a Purificação de Proteínas por Cromatografia de Afinidade,* Mestrado em Química, Universidade da Beira interior, Covilhã.

[126] Schluep, T., Cooney, C.L.(1998). Purification of plasmid DNA by triplex affinity interactions. *Nucleic Acids Res*., vol. 26, pp. 4524–4528.

[127] Wils, P., Escriou, V., Warnery, A., Lacroix, F., Lagneaux, D., Ollivier, M., Crouzet, J., Mayaux, J.F., Scherman, D. (1997). Efficient purification of plasmid DNA for gene transfer using triple-helix affinity chromatography. *Gene Therapy*, vol. 4, pp. 323–330.

[128] Danquah, M.K., Forde, G.M. (2007). The suitability of DEAE-Cl active groups on customized poly(GMA-co-EDMA) continuous stationary phase for fast enzyme-free isolation of plasmid DNA. *J. Chromatogr. B*, vol. 853, pp. 38-46.

[129] Frydlová, J., Kucerová, Z., Tichá, M. (2008). Interaction of pepsin with aromatic amino acids and their derivates immobilized to Sepharose. *J. Chromatogr. B*, vol. 863, pp. 135–140.

[130] Jungbauer, A., Hahn, R. (2004). Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology. *J. Sep. Sci*., vol. 27, pp.767–778.

[131] Mallik, R., Hage, D.S. (2006). Affinity monolith chromatography. *J. Sep.* Sci., vol. 29, pp. 1686–1704.

[132] Santos, P. V. (2007). *Corantes Cianínicos Funcionais. Bioaplicações,* X Jornadas de Química Industrial e V jornadas de Bioquímica, Universidade da Beira interior, Covilhã.

[133] Wilson, K., Walker, J.M. (1994). *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*, Cambridge University Press, UK.

[134] Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Smith, P. K. (1992). *Immobilised Affinity Ligand Techniques,* Academic Press, New York.

[135] Chaga, G.S. (2001). Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *J. Biochem. Biophys. Methods,* vol. 49, pp. 313-334.

[136] Martins, S., Pacheco, V., Pacheco, R., Karmali, A., Brown, P.R. (2000). Differential chromatographic behaviour of recombinant wild-type and altered amidases in immobilized metal chelates. *International J. Biochromatogr.*, vol. 6. pp. 82-85.

[137] Murphy, J.C., Jewell, D.L., White, K.I., Fox, G.E., Willson, R.C. (2003) Nucleic acid separations utilizing immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnol. Prog*. vol. 19, pp. 982–986.

[138] Cano, T. (2005) Separation of genomic DNA from plasmid DNA by selective renaturation with immobilized metal affinity capture. *Biotechnol. Prog.,* vol. 21, pp. 1472–1477.

[139] Tan, L., Lai, W.B., Lee, C.T., Kim, D.S., Choe, W.S. (2007) Differential interactions of plasmid DNA, RNA and endotoxin with immobilised and free metal ions. *J. Chromatogr. A*., vol. 1141, pp. 226–234.

[140] Chubb, J. M., Hogan, M. E. (1992). Human therapeutics based on triple helix technology. *Trends Biotechnol.*, vol. 10, pp.132-136.

[141] Sun, J.S., Hèléne, C. (1993). Oligonucleotide-directed triple-helix formation. *Curr Opin Struct Biol.*, vol. 3, pp. 345–356.

[142] Mirkin, S. M., Lyamichev, V. I., Drushlyak, K. N., Dobrynin, V. N., Filippov, S. A., Kamenetskii, M. D. (1987). DNA H form requires a homopurine-homopyrimidine mirror repeat. *Nature*, vol. 330, pp. 495-497.

[143] Wils, P., Escriou, V., Warney, A., Lacroix, F., Lagneaux, D., Ollivier, M., Crouzet, J., Mayaux, J-F., Schermann, D. (1997). Efficient purification of plasmid DNA for gene transfer using triple-helix affinity. *Gene Ther.*, vol. 4, pp. 323-330.

[144] Klug, A. (1999). Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *J. Molec. Biology*, vol. 293, pp. 215-218.

[145] Laity, J. H., Lee, B. M., Wright, P.E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 11, pp. 39 - 46.

[146] Woodgate, J. (2002). Protein-mediated isolation of plasmid DNA by a zinc finger-glutathione S-transferase affinity linker. *Biotechnol. Bioeng.* vol. 79, pp. 450–456.

[147] Sousa, F., Prazeres, D.M.F., Queiroz, J.A. (2008). Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends in Biotechnol.*, vol. 26, pp. 518-525.

[148] Vijayalakshmi, M.A. (1996). Histidine ligand affinity chromatography. *Mol. Biotechnol.,* vol. 6, pp. 347–357.

[149] Luscombe, N.M., Laskowski, J. M., Thornton, J.M. (2001). Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res.* vol. 29, pp. 2860–2874.

[150] Hoffman, M.M. Khrapov, M. A., Cox, J. C., Yao, J., Tong, L., Ellington, A. D.(2004). AANT: the Amino Acid-Nucleotide Interaction Database. *Nucleic Acids Res.* vol. 32, pp. 174–181.

[151] Wu, X., Haupt, K., Vijayalakshmi, M.A. (1992). Separation of immunoglobulin G by high-performance pseudo-bioaffinity chromatography with immobilized histidine. Preliminary report on the influence of the silica support and the coupling mode. *J. Chromatogr.,* vol. 584, pp. 35–41.

[152] Delattre, C., Michaud, P., Hamze, K., Courtois, B., Courtois, J., Vijayalakshmi, M.A. (2005). Purification of oligouronides using hollow-fiber membrane functionalised with L histidine. *J. Chromatogr. A,* vol. 1099, pp. 121–126.

[153] Sousa, F., Freitas, S., Azzoni, A.R., Prazeres, D.M.F., Queiroz, J.A.(2006). Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 45, pp.131–140.

[154] Sousa, F., Matos, T., Prazeres, D.M.F., Queiroz, J.A. (2008) Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. *Anal. Biochem.,* vol. 374, pp. 432–434.

[155] Sousa, F., Tomaz, C.T., Prazeres, D.M.F., Queiroz, J.A. (2005). Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine–agarose support. *Anal. Biochem*., vol. 343, pp. 183–185.

[156] Schleef, M. (1999). *Issues of large-scale plasmid DNA manufacturing, In Recombinant proteins, monoclonal antibodies and therapeutic genes*, wiley-VCH, Weinheim.

[157] Vyas, V. V., Gupta, S., Sharma, P. (1994). Stability of recombinat shuttle plasmid in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol*. vol. 16, pp. 240-246.

[158] Zhang, J., Greasham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* vol. 51, pp. 407-421.

[159] Boissonnas, R.A., Guttmann, S., Huguenin, R.L., Jaquenoud, P-A., Sandrin, E.(1958). *Helv. Chim. Acta*., vol 41, pp. 1867-1882.

[160] Hermanson, G.T., Mallia, A. K., Smith, P.K. (1992). *Immobilized Affinity Ligand Techniques*. Academic Press: New York.

[161] Arakawa, T., Tsumoto, K., Nagase, K., Ejima, D. (2007). The effects of arginine on protein binding and elution in hydrophobic interaction and ionexchange chromatography, *Protein Expr. Purif*., vol. 54, pp. 110–116.

[162] Sousa, F., Prazeres, D. M. F., Queiroz, J. A. (2008). Binding and elution strategy for improved performance of arginine affinity chromatography in supercoiled plasmid DNA purification. *Biomed. Chromatogr.*, vol. 23, pp. 160-165.

[163] Sousa, F., Prazeres, D. M. F., Queiroz, J. A. (2008). Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *J. Gene Med.*, vol. 11, pp. 79-88.

[164] Schleef, M., Schmidt, T. (2004). Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications. *J. Gene Med.* vol. 6, pp. 45-53.